



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(21) Patentansøgning nr.: 1371/81

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 15/06

(22) Indleveringsdag: 26 mar 1981

C 07 K 17/02

(41) Alm. tilgængelig: 01 okt 1981

G 01 N 33/76

(44) Fremlagt: 24 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 31 mar 1980 JP 42484/80 13 jun 1980 JP 80467/80 14 jan 1981 JP 4507/81

(71) Ansøger: *Takeda Chemical Industries Ltd.; 27, Doshomachi 2-chome; Higashi-ku; Osaka, JP

(72) Opfinder: Susumu *Iwasa; JP, Isamu *Yoshida; JP, Koichi *Kondo; JP

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Fremgangsmåde til isolering af specifikke antistoffer og enzym-immunbestemmelsesmetode med anvendelse af det isolerede antistof

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1371-81

Fremgangsmåde til enzym-immunbestemmelse, fremgangsmåde til fremstilling af specifikke antistoffer til brug i fremgangsmåden og prøvesæt til brug ved fremgangsmåden

Fremstilling af et specifikt antistof ved at bringe et på en bærer uopløseliggjort, for dannelse af et til et peptid-antigen specifikt antistof essentielt peptid i kontakt med en legemsvæske indeholdende et over for antigenet reaktivt antistof, og påfølgende eluering af et absorberede antistof. Eksempler på essentielle peptider er, ved fremstilling af specifikt antistof til humant chorio-gonadotropin H-R¹-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH (a), hvor R¹ er et peptidfragment med 1-14 aminosyrerester inklusive Gly i 14-stillingen i Ala¹-Pro²-Pro³-Pro⁴-Ser⁵-Leu⁶-Pro⁷-Ser⁸-Pro⁹-Ser¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Pro¹³-Gly¹⁴, ved fremstilling af specifikt antistof til pankreatisk glukagon, H-R²-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-R³-Asn-Thr-OH (b), hvor R² er et peptidfragment med

1-10 aminosyrerester inklusive Asp i 10-stillingen i β-Ala¹-Tyr²-Leu³-Asp⁴-Ser⁵-Arg⁶-Arg⁷-Ala⁸-Gln⁹-Asp¹⁰, og R³ er Met eller Nle; og ved fremstilling af specifikt antistof til insulin H-R⁴-Gly-Phe-Phe-R⁵OH (c), hvor R⁴ er et peptidfragment med 1-3 aminosyrerester inklusive Arg i 3-stillingen i Gly¹-Glu²-Arg³, og R⁵ er et peptidfragment med 1-5 aminosyrerester inklusive Tyr i 1-stillingen i Tyr¹-Thr²-Pro³-Lys⁴-Thr⁵.

Det specifikke antistof kan bruges i en enzym-immunbestemmelsesmetode, ved hvilken en kendt mængde af antistof-fet i uopløselig form og en kendt mængde enzymmateriale bringes i kontakt med en prøvoveske indeholdende en ukendt mængde antigen, hvorpå den enzymatiske aktivitet af enzym-materialet måles i væskefasen, eller at det reagerede enzymmateriale måles i den faste fase, hvorved antigenmængden i prøvovesken bestemmes. Antistoffet i opløselig form og enzymmaterialet kan også sættes til den antigenholdige prøvoveske for at bevirke en konkurrerende bindingsreaktion, og derpå tilsætte en kendt mængde af et andet antistof, som er uopløseligt i forhold til det første, og derpå foretage bestemmelsen. Metoden har høj reproducerbarhed og er især egnet til bestemmelse af humant chorio-gonadotropin og pankreatisk glukagon.

Enzymmaterialet kan være et frysetørret præparat fremstillet af et vandigt præparat indeholdende β-D-galaktosidase eller et konjugat heraf med et immunaktivt materiale samt en sukkerart eller sukkeralkohol, fx H-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH og sakkaro-se.

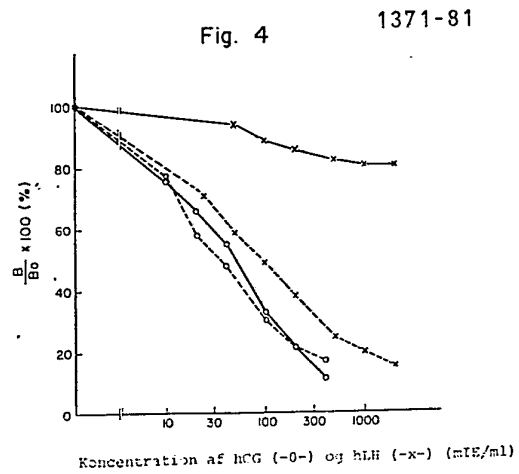
Enzymmaterialet kan også være et peptid-enzym-konjugat fremstillet ved kobling af et mærkningsenzym, fx glykosidase, fosfatase, β-galactosidase eller alkalifosfatase, med et peptid med foranstående formel (a).

Fig. 4 viser standardkurver for enzym-immunbestemmelse af humant chorio-gonadotropin (o) og humant luteiniseringshormon (x), dels med et i princippet konventionelt anti-humant chorio-gonadotropin-antistof (brudt linje), dels med

fortsættes

1371-81

et specifikt anti-humant chorio-gonadotropin-antistof fremstillet i henhold til opfindelsen (fuldt optrukket kurve). I begge tilfælde anvendtes et konjugat af humant chorio-gonadotropin og et mærkningsenzym. Kurverne viser at det i henhold til opfindelsen fremstillede specifikke antistof er højfølsomt og i modsætning til det konventionelle antistof ikke giver forveksling med luteiniseringshormon-antistof.



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til isolering af specifikke antistoffer, ifølge opfindelsen ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne; og tillige en fremgangsmåde til enzym-immunbestemmelse (i det følgende undertiden også for korthedens skyld betegnet EIA) under anvendelse af et antistof som reagens. EIA-metoden er ejendommelig ved det i krav 6's kendetegnende del angivne.

Biobestemmelse og immunbestemmelse er fremgangsmåder der for tiden anvendes til højfølsomme kvantitative bestemmelser af fysiologisk aktive peptider inklusive hormoner, men biobestemmelse har de ulemper, at fremgangsmåden er kompliceret og reproducerbarheden dårlig. På den anden side har immunbestemmelser som repræsenteret ved radioimmunbestemmelse (i det følgende undertiden for korthedens skyld benævnt RIA) og enzym-immunbestemmelse fordelene ved en mindre kompliceret fremgangsmåde og overlegen kvantitativ nøjagtighed og reproducerbarhed, men kan give varierende resultater alt efter den anvendte type antistof, og kræver nærmere prøvelse af specificiteten. Fx kan der være problemer ved den kvantitative bestemmelse af humant chorio-gonadotropin (i det efterfølgende for korthedens skyld undertiden benævnt hCG) på grund af dets kryds-reaktivitet med luteiniseringshormonet (i det følgende undertiden betegnet hLH), og ved bestemmelse af pancreatisk glucagon (i det følgende også betegnet PG) kan det kryds-reaktivitet med tarmglucagon (i det følgende undertiden betegnet tarm-GLI) frembyde problemer.

I den senere tid har den kemiske analyse af disse peptid-hormoner gjort et væsentligt skridt fremad, og der er nu akkumuleret betydelig viden om de immunologisk specifikke steder på sådanne peptider såvel som de dele deraf som de deler med andre hormoner.

På basis af sådan viden er der blevet syntetiseret forskellige peptidsegmenter ved kemiske fremgangsmåder, og de frembyder immunologisk specifikke steder på hormoner som skal

bestemmes kvantitativt, dvs. dele som de ikke har tilfælles med andre hormoner, og det har vist sig at det er muligt at fremstille et antistof med meget høj specificitet til mål-peptidantigenet ved absorption af det specifikke antistof med et sådant specifikt peptidfragment (partielt peptid).

Humant chorio-gonadotropin er et proteohormon der dannes af chorio-celler der dannes ved svangerskab og stimulerer secerneringsen af progesteron. Opdagelse af hCG har almindeligt været udnyttet til tidlig diagnose af svangerskab. Desuden er der for nylig opdaget en gruppe maligne tumorer af hCG-oprindelse, navnlig et chorio-carcinom, og hCG er konstateret i høje titere i urin, blod og spinalvæske hos tumorbærende patienter. Det er således blevet klart at den kvalitative og kvantitative bestemmelse af dette hormon er betydningsfuldt for diagnosen såvel som til fremskaffelse af et billede af den kliniske tilstand af sådanne sygdomme. En sådan diagnose fordrer imidlertid at man er i stand til at opdage en spormængde af hCG, der er så lille som ca. 100 IE/l, og det problem der er involveret i en immunologisk kryds-reaktivitet af hCG med strukturelt analoge proteohormoner, dvs. luteiniseringshormon, follicle-stimulerende hormon (hFSH) og thyreoid-stimulerende hormon (hTSH). Specielt gælder det at eftersom hLH i høj grad ligner hCG og koncentrationen af hLH i fysiologisk urin undertiden kan være så høj som 100-150 IE/l, må hCG differentieres immunologisk fra hLH for at man kan blive i stand til nøjagtigt at bedømme de små bitte mængder hCG i legemsvæsker.

I den nyeste tid har den kemiske analyse af disse proteohormoner taget yderligere et skridt fremad og det har nu vist sig at kryds-reaktiviteten af disse hormoner stammer fra deres α -underenheder som strukturelt har temmelig meget tilfælles. Man har derfor gjort forsøg på at adskille og rense β -underenheden af hCG (i det følgende også forkortet til hCG- β), som har en forholdsvis distinkt struktur, og på at fremstille et anti-hCG- β -antistof under udnyttelse af underenheden til specifik opdagelse af hCG. Adskillelse og rensning af hCG- β indebærer imidlertid en kompliceret procedure,

og det er meget vanskeligt at forhindre forurening med hCG og dets α -underenhed (i det følgende hCG- α). På grund af tilstedeværelsen af disse urenheder og den aminosyresekvens, der er fælles for hCG og hLH, overvinder anti-hCG- β -antistoffet ikke fuldstændigt problemet med kryds-reaktivitet mellem hCG og hLH. Desuden er affiniteten af dette anti-hCG- β -antistof til hCG lavere end affiniteten af anti-hCG-antistof til hCG, hvilket bevirker en nedsættelse af følsomheden.

Den peptiddel, der befinder sig ved C-terminalen af hCG- β og som består af ca. 30 aminosyrerester, har imidlertid en aminosyresekvens som ikke genfindes hos hLH, og det viste sig at denne peptiddel muliggør en distinkt identifikation af hCG over for hLH. På basis af denne strukturanalyse syntetiserede Matsuura et al et C-terminalt peptid af hCG- β , immuniserede kaniner med peptidet for at vinde et hCG-specifikt antiserum og gennemførte en radioimmunbestemmelse (Endocrinology 104, side 396, 1979). Skønt de opnåede en tilfredsstillende grad af specificitet på denne måde, viste det sig at deres metodes følsomhed ikke var så høj som det kunne ønskes.

Under de forannævnte teknologiske omstændigheder blev der foretaget en intensiv forskning for at udvikle et anti-hCG-antistof som kunne være i stand til at opdage hCG med forbedret specificitet og forøget følsomhed. Under udarbejdelse af opfindelsen blev dyr immuniseret med hCG, og man absorberede det resulterende anti-hCG-antistof på en bærer på hvilken der var immobiliseret et vist syntetisk C-terminalt peptid af hCG- β til frembringelse af et anti-hCG-antistof, og det viste sig at dette absorberede anti-hCG-antistof er specifikt til hCG uden at udvise kryds-reaktivitet med hLH og andre proteohormoner. Dette resultat fulgtes op ved yderligere undersøgelser som resulterede i det yderligere resultat at en enzymimmunbestemmelse under anvendelse af et enzym mærket hCG- β C-terminalt peptid er meget nyttigt for en specifik og højfølsom opdagelse af hCG.

Opfindelsen angår følgende:

I) En fremgangsmåde til isolering af specifikke anti-

stoffer, hvilken fremgangsmåde består i at man bringer et peptid, der har en struktur som er enestående for et peptid-antigen og som er uopløseliggjort på en bærer, i kontakt med en legemsvæske som indeholder det specifikke antistof
5 der er reaktivt over for nævnte antigen, hvorpå man eluerer det på denne måde absorberede antistof.

II) En enzym-immunbestemmelsesmetode som indebærer anvendelse af et antistof som reagens, hvilken metode består i at man som antistof bruger et antistof isoleret ved at
10 et peptid, der har en struktur som er enestående for et peptid-antigen og som er uopløseliggjort på en bærer, er bragt i kontakt med en legemsvæske indeholdende et antistof som er reaktivt over for nævnte antigen og det således absorberede antistof derefter er elueret.

15 Enzym-immunbestemmelse ifølge den foreliggende opfindelse kan fx ske i praksis som følger:

(1) Tilsætning af en kendt mængde af et peptid-enzym-konjugat og en kendt mængde af en uopløselig form af antistof, som anført foran, til en prøvewæske indeholdende en
20 ukendt mængde antigen, hvorpå man måler den enzymatiske aktivitet af peptid-enzym-konjugatet i væskefasen eller af det reagerede peptid-enzym-konjugat i den faste fase til bestemmelse af mængden af antigen i prøvewæsken (FEBS Letters 15, side 232, 1971);

25 (2) Man sætter en kendt mængde af et peptid-enzym-konjugat og en kendt mængde af den opløselige form af antistof til en antigen-indeholdende prøvewæske for at bevirke en konkurrerende bindingsreaktion, hvorpå man tilsætter en kendt mængde af et andet antistof som anført foran, som
30 er uopløseligt i forhold til det første antistof (hvis fx antistoffet var blevet fremstillet ud fra kaninserum, så anti-kanin-immunoglobulin G (IgG) antistof) og på samme måde som ovenfor under (1) måler den enzymatiske aktivitet i væskefase eller fast fase for at bestemme mængden af antigen i
35 prøvewæsken (FEBS Letters, se ovenfor);

(3) Man sætter en kendt mængde af et peptid-enzym-konjugat og en kendt mængde af en opløselig form for antistof til en antigenholdig prøvevæske for at bevirke en konkurrerende bindingsreaktion på samme måde som ovennævnte bestemmelse (2), hvorpå man tilsætter en kendt mængde af et antistof som anført foran og, hvis det andet antistof er et anti-dyr IgG-antistof, en kendt mængde normalt dyreserum for at bevirke en udfældningsreaktion og, på samme måde som bestemt ved metode (1) måler den enzymatiske aktivitet i væskefasen eller den faste fase for at bestemme mængden af hCG i prøvevæsken (Clinica Chimica Acta 67, side 283, 1976).

Ved alle de ovennævnte bestemmelser er det mest fordelagtigt at måle aktiviteten i den faste fase fordi målingen af enzymatisk aktivitet i væskefasen kan lide under interferens fra urenheder i prøvevæsken. Med hensyn til reproducerbarhed og følsomhed foretrækkes "dobbeltantistof-prøverne", dvs. prøverne (2) og (3) foran, fordi disse bestemmelser kun fordrer en ringe mængde antistof.

De peptid-antigener som skal bestemmes kvantitativt i overensstemmelse med tilstedeværende EIA er de peptidhormoner, der forekommer i pattedyrlegemer og som omfatter hCG, hLH, tyroidstimulerende hormon, follikel-stimulerende hormon, PG, insulin, væksthormonet og andre hormoner. Som eksempler på sådanne pattedyr kan nævnes menneske, hornkvæg, hest, får, kanin, rotte, marsvin, hund, svin og aber.

Den prøvevæske til hvilken EIA ifølge den foreliggende opfindelse kan appliceres, kan være en hvilken som helst af fx legemsvæskerne urin, serum og spinalvæske; men i almindelighed foretrækkes urin og serum.

Det antistof som bruges i EIA til opdagelse af hCG kan være et hvilket som helst antistof som er reaktivt i forhold til det C-terminale peptid i hCG- β . Eksempler på sådanne antistoffer er det konventionelle anti-hCG-antistof, det specifikke anti-hCG-antistof som kan isoleres ved den ifølge den foreliggende opfindelse udviklede fremgangsmåde, det anti-hCG-serum som kan vindes ved immunisering med hCG, det

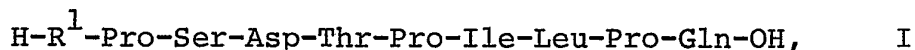
anti-hCG- β -serum som kan vindes ved immunisering med hCG- β ,
 det anti-C-terminale peptids serum som kan vindes ved immuni-
 sering med det C-terminale peptid fra hCG- β og de γ -globulin-
 fraktioner som kan vindes fra disse antisera, idet de isole-
 5 res ved den foreliggende fremgangsmåde.

Ved isolering i overensstemmelse med den foreliggen-
 de opfindelse af et antistof podes et dyr med det pågældende
 særlige peptid-antigen i dyrets legemsvæske. Dette dyr kan
 være en hvilken som helst dyreart undtagen menneske, såsom
 10 varmlodede pattedyr såsom kanin, får, rotte, mus, marsvin,
 hornkvæg, hest, svin, ged, en fugleart som fx høns, duer,
 ænder, gæs, vagtler, eller koldblodede dyr som fx frøer.

Podningen af sådanne dyr med et peptid-antigen kan
 udføres på den konventionelle måde.

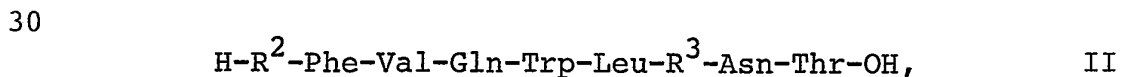
15 Derpå opsamles legemsvæsken indeholdende et sådant an-
 tistof og det bringes i kontakt med et peptid der har en
 speciel struktur som er enestående for peptid-antigenet og
 som ikke er fælles med andre, lignende peptidhormoner. Som ek-
 sempler på sådanne peptider kan de følgende peptider nævnes:

20 Ved isolering af et specifikt antistof mod hCG,
 det peptid der har den almene formel



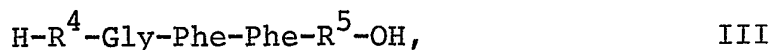
25 hvor R^1 er et peptidfragment med 1-14 aminosyrerester inklusive
 Gly i 14-stillingen i $\text{Ala}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Pro}^4\text{-Ser}^5\text{-Leu}^6\text{-Pro}^7\text{-Ser}^8\text{-}$
 $\text{Pro}^9\text{-Ser}^{10}\text{-Arg}^{11}\text{-Leu}^{12}\text{-Pro}^{13}\text{-Gly}^{14}$;

ved isolering af et specifikt antistof mod PG, det
 peptid der har den almene formel



35 hvor R^2 er et peptidfragment med 1-10 aminosyrerester inklusi-
 ve Asp i 10-stillingen i $\beta\text{-Ala}^1\text{-Tyr}^2\text{-Leu}^3\text{-Asp}^4\text{-Ser}^5\text{-Arg}^6\text{-Arg}^7\text{-}$
 $\text{Ala}^8\text{-Gln}^9\text{-Asp}^{10}$, og R^3 er Met eller Nle (se europæisk patent-
 publikation nr. 9147);

og til isolering af et specifikt antistof mod insulin, et peptid med den almene formel



5 hvor R^4 er et peptidfragment med 1-3 aminosyrerester inklusive Arg i 3-stillingen i Gly¹-Glu²-Arg³, og R^5 er et peptidfragment med 1-5 aminosyrerester inklusive Tyr i 1-stillingen i Tyr¹-Thr²-Pro³-Lys⁴-Thr⁵.

10 Som eksempel på peptidfragmenterne med 1-14 aminosyrerester inklusive Gly i 14-stillingen i peptid R^1 (dvs. Ala¹-Pro²-Pro³-Pro⁴-Ser⁵-Leu⁶-Pro⁷-Ser⁸-Pro⁹-Ser¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Pro¹³-Gly¹⁴), der bruges ved isolering af et specifikt antistof til hCG kan nævnes Gly, Pro-Gly, Leu-Pro-Gly, Arg-
15 Leu-Pro-Gly, Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly, Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly,
20 Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly og Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly.

Som eksempler på peptidfragmentet med 1-10 aminosyrerester inklusive Asp i 10-stillingen i R^2 (dvs. β -Ala¹-Tyr²-Leu³-Asp⁴-Ser⁵-Arg⁶-Arg⁷-Ala⁸-Gln⁹-Asp¹⁰), der anvendes ved
25 isolering af et specifikt antistof til PG, kan nævnes Asp, Gln-Asp, Ala-Gln-Asp, Arg-Ala-Gln-Asp, Arg-Arg-Ala-Gln-Asp, Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp, Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp, Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp, Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp og β -Ala-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp.

30 Som eksempler på peptidfragmentet med 1-3 aminosyrerester inklusive Arg i 1-stillingen af R^4 (Gly¹-Glu²-Arg³-), der bruges ved isolering af et specifikt antistof til insulin kan nævnes Arg, Glu-Arg og Gly-Glu-Arg. Hvad angår peptidfragmentet med 1-5 aminosyrerester inklusive Tyr i 1-stillingen i R^5 , dvs. Tyr¹-Thr²-Pro³-Lys⁴-Thr⁵-, kan nævnes Tyr,
35 Tyr-Thr, Tyr-Thr-Pro, Tyr-Thr-Pro-Lys og Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr.

De forskellige peptider som bruges i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse kan fremstilles på i og for sig kendt måde. Selv om der kan bruges både fastfastmetoder og væskefasemetoder til syntesen, er sidstnævnte metode ofte den mest fordelagtige. Sådanne metoder til peptidsyntese omfatter dem der er beskrevet i litteraturen, fx Schröder og Lubke, *The Peptides*, bind 1 (1966), Academic Press, New York, USA, og Izumiya et al, "Peptide Gosei" (peptidsyntese) (1975), Maruzen Inc., Japan, nemlig azidmetoden, kloridmetoden, syreanhydridmetoden, den blandede syreanhydridmetode, DCC-metoden, den aktive estermetode, Woodward's reagens K-metoden, karbodiimidazolmetoden, reduktion-oxydations-metoden, DCC-additiv-metoden (fx HONB, HOBt, HOSu) og så fremdeles.

Det bæremateriale der bruges til isolering af det specifikke antistof i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse omfatter bl.a. gelperler, fx agarosegel såsom "Sephrose" [®] 4B, "Sephrose" [®] 6B, dextrangel såsom "Sephadex" [®] G75, "Sephadex" [®] G100, "Sephadex" [®] G200, polyakrylamidgel såsom "Biogel" [®] P30, "Biogel" [®] P60, "Biogel" [®] P100; partikler af cellulose som fx "Avicel" fra Asahi Kasei Inc. i Japan, ionbyttercellulose såsom diætylaminoætylcellulose og karboxymetylcellulose, fysiske adsorbenter såsom glasperler, glasstave, aminoalkyl-glasperler, aminoalkyl-glasstænger, silikonegummier, styrenharpikser, fx polystyrenperler og polystyrenkorn, ionbytterharpikser såsom svagt sure ionbytterharpikser såsom "Amberlite" [®] IRC-50, "Zeocarb" [®] 226 og svagt basiske ionbytterharpikser såsom "Amberlite" [®] IR-4B og "Dowex" [®] 3.

Uopløseliggørelse af peptidet fra en sådan bærer kan udføres på konventionel måde. Blandt de kendte metoder til fremstilling af uopløseliggjorte peptider er dem der er beskrevet fx i "Metabolism" 8, 1971, side 696. Fx kan man bruge cyanogenbromidmetoden, GLA-metoden og DCC-metoden. Den foretrukne metode består i at aktivere bæreren med cyanogenbromid og så koble peptidet til den aktiverede bærer.

En legemsvæske indeholdende antistoffet bringes i kontakt med det peptid der har en struktur

som er enestående for peptid-antigenet som uopløseliggjort på en bærer på følgende måde. Således kan legemsvæsken fx udfældes fraktioneret, hvorpå man direkte eller efter isolati-
on af dets immunoglobulin G-fraktion ved søjlekromatografi
5 bringer fraktionen i kontakt med ovennævnte uopløseliggjorte peptid. Den ovennævnte udsaltningsproces kan udføres ved hjælp af natriumsulfat, ammoniumsulfat, magniumsulfat, kaliumfosfat, natriumcitrat eller lignende salt. Den nævnte søjle-
kromatografi udføres ved hjælp af fx diætylaminoætylcellulose (DEAE-cellulose), karboxymetylcellulose (CM-cellulose),
10 DEAE-"Sephadex", "Sephadex" G 150, "Sephadex" G 200 og lignende materialer.

Elueringen af det specifikt absorberede antistof udføres ved hjælp af en pufferopløsning med lav pH-værdi eller høj pH-værdi, eller med en pufferopløsning indeholdende en høj koncentration af et salt. Også andre eluanter kan bruges.

En pufferopløsning med lav pH-værdi kan fx være en 0,17M glycin-saltsyrepuffer med pH 2,3, eller en 0,1M natriumcitrat-saltsyrepuffer med pH 1,8.

En pufferopløsning med høj pH-værdi kan fx være ammoniakvand ved pH 11 eller 0,2M natriumboratpuffer med pH 11,7.

En pufferopløsning indeholdende høj koncentration af et salt kan være fx 6M guanidin-hydrokloridopløsning eller
25 en 7M urinstofopløsning.

Den ovennævnte elueringsprocedure kan udføres portionsvis eller ved hjælp af en kolonne.

Det antistofholdige eluat renses, fx ved dialyse. Fx kan eluatet først neutraliseres, fx med 0,1M natriumkarbonatpuffer (pH 10,5) hvis det har været brugt en pufferopløsning med lav pH-værdi som elueringsmiddel, eller med 0,1M glycin-saltsyrepuffer (pH 3,0) hvis der som elueringsmiddel har været brugt en pufferopløsning med høj pH-værdi, hvorpå der dialyseres mod fx 0,02M fosfat-NaCl (pH 8,0) indeholdende
35 0,1% NaN_3 . Det eluat der vindes med nævnte pufferopløsning og indeholdende en høj koncentration af NaCl kan dialyseres

direkte mod ovennævnte fosfat-NaCl-puffer og oplagres som sådan. Desuden kan ovennævnte eluat eller dialysat frysetørres og oplagres som et lyofilisat.

Det specifikke antistof der isoleres ved fremgangs-
5 måden ifølge den foreliggende opfindelse kan bruges ved RIA, EIA, latex- og erythrocytagglutationsreaktioner og lignende reaktioner, og tillader ved alle disse procedurer en specifik opdagelse af target-peptidantigenet uden interferering af krydsreaktive "inhiberende" peptidforbindelser der samtidig
10 er til stede i prøvevæsken. Specielt tillader anvendelse af det ifølge opfindelsen isolerede antistof på EIA bestemmelser i kliniske laboratorier som ikke er tilstrækkeligt udstyret til håndtering af radioaktive isotoper, og den er også værdifuld ved at sikre en praktisk gennemførlig, højfølsom
15 bedømmelse af peptid-antigener i urinprøver og blodprøver.

Mere konkret kan man bringe en anti-hCG-antistofholdig legemsvæske, vundet ved immunisering af et dyr med hCG, navnlig dyrets serum, i kontakt med det uopløseliggjorte peptid med den almene formel I på bæreren. I dette trin under-
20 kastes legemsvæsken en udsaltningsudfældning med fx natriumsulfat eller ammoniumsulfat, og enten direkte eller efter fraskillelse af IgG-fraktionen med søjlekromatografi med DEAE-cellulose eller en lignende substans bringes det ovennævnte uopløseliggjorte peptid i kontakt med nævnte væske
25 eller fraktion for selektivt at absorbere det specifikke anti-hCG-antistof på den faste fase. På denne måde kan man eliminere anti-hCG-antistoffer, der udviser krydsreaktivitet med hLH, hFSH og hTSH. Derefter elueres det specifikke anti-hCG-antistof som er absorberet på den faste fase. Denne elue-
30 ring udføres med en pufferopløsning med lav pH-værdi eller høj pH-værdi (fx 0,17M glycin-HCl puffer med pH 2,3; eller ammoniakvand med pH 11) eller en pufferopløsning indeholdende en høj koncentration af et salt (fx 6M guanidin-saltsyreopløsning eller 7M urinstofopløsning), hvorved den specifikke
35 antistoffraktion fraskilles. Selv om denne procedure kan udføres ved en portionsvis metode, foretrækkes det at bruge en kolonne.

Når der bruges et konjugat af et peptid (I): H-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH og "Sephacrose" [®] 4B ved fremstilling af det specifikke antistof, kan der udvindes et i

5 høj grad specifikt anti-hCG-antistof i godt udbytte.

De fysiske egenskaber af dette antistof er som følger.

(1) Ved en sluttelig fortynding på 10-200 ng/ml er det i stand til at binde 10-100% af et hCG-mærkningsenzymkonjugat, et peptid (I)-mærkningsenzymkonjugat, et peptid (II)-mærkningsenzymkonjugat og et peptid (III)-mærkningsenzymkonjugat,

10 hvis enzymatiske aktivitet er ca. 2 μ E; (2) dets optimale pH for antigen-bindingsaktivitet er pH 6-9; (3) det er stabilt i mere end 1 år under køleskabsbetingelser; (4) det har en molekylvægt mellem ca. 140000 og 170000 og indeholder ca.

15 2-7% sukker; (5) det er letopløseligt i vandigt medium ved pH 2-12; (6) dets elektroforetiske opførsel er af type som den hos γ -globulinfraktionen; (7) det har ultraviolet absorptionsspektrum som vist i fig. 1; (8) dets aminosyresammensætning, udtrykt ved antallet af mol af hver aminosyre pr. 100

20 mol glycin, er: lysin 85-97, histidin 35-43, arginin 38-45, asparaginsyre 110-132, threonin 98-107, serin 118-135, glutaminsyre 138-145, prolin 92-134, glycin 100, alanin 73-79, valin 129-138, methionin 2-10, isoleucin 28-37, leucin 100-112, tyrosin 38-48 og fenylalanin 55-68; (9) dets molekyle

25 er sammensat to H-kæder og to L-kæder sammenkoblet med S-S-bindinger. Peptiderne (II) og (III) fremstilles ifølge omstående referenceeksempler 2 og 3.

Det således vundne specifikke antistof er efter isolering nyttigt som reagens i den ovenfor nævnte EIA. I sammenligning med de kon-

30 ventionelle fremgangsmåder til opdagelse af peptid-antigen, giver enzym-immunbestemmelsen ifølge den foreliggende opfindelse meget specifikke resultater og er meget nyttig i kraft af at den er fri for interferens fra ledsagestoffer i prøvetvæskerne. Følsomheden er høj nok til at gøre fremgangsmåden

35 anvendelig til tidlig diagnose og til prognostisk behandling af chorion-tumorer og andre sygdomme. Således er EIA i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse praktiserbar

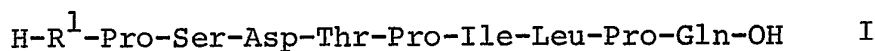
selv i et klinisk laboratorium hvor der ikke let kan anvendes radioaktive isotoper, og den tillader en praktisk og specifik bedømmelse af koncentrationen af det ønskede peptid-antigen i prøvevæsken.

5 Det andet antistof der bruges i EIA ifølge den foreliggende opfindelse kan fremstilles ved gentagne injektioner af IgG fra et dyr af den art, der bruges ved fremstilling af antistof (fx kanin), i et dyr af en anden art, fx ged. Immuniseringsprocessen kan være en hvilken som helst af dem der rutinemæssigt bruges til fremstilling af antistoffer. Som eksempel kan der indgives ca. 2 mg pr. dosis IgG, sammen med Freund's fuldstændige adjuvans, subkutant med mellemrum på 10 3 uger, ialt ca. 4 gange. Denne fremgangsmåde giver et tilfredsstillende antistof. Man kan også bruge det i handelen gående anti-kanin IgG-serum (ged) fra Miles Laboratories, 15 USA.

Det andet uopløselige antistof fremstilles ved fældning af ovennævnte anti-IgG-serum med natriumsulfat eller ammoniumsulfat, fraskillelse af IgG-fraktionen ved DEAE-cellulose-søjlekromatografi og kobling deraf til en fast 20 fase såsom cyanogenbromid-aktiveret cellulose eller "Sephadex" [®] (FEBS Letters 15, 1971, side 232). Den ovennævnte antiserum IgG-fraktion kan imidlertid også bringes i kontakt med en silikonegummi eller polystyrenperler for fysisk 25 at adsorbere det andet antistof på den faste fase (Kagaku-to-Seibutsu (Kemi og Biologi) 14 (1976), side 741).

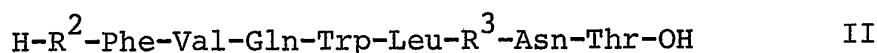
Ved den foreliggende EIA bruges et peptid-mærkningsenzym-konjugat som et af reagenserne.

Peptidet i peptidmærknings-enzymkonjugatet kan være 30 selve peptid-antigenet som sådant, men for at opnå en endnu højere selektivitet bruges der et peptidmærknings-enzymkonjugat indeholdende et peptid som har en struktur der er enestående for nævnte peptid-antigen. Til kvantitativ bestemmelse af fx hCG foretrækkes det at bruge et peptid-enzym-konjugat som kan vindes ved en kobling 35 af et mærkningsenzym til et peptid med den almene formel



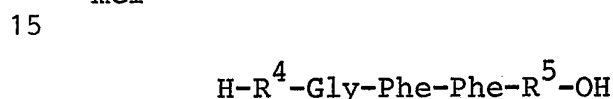
hvor R^1 har den foran angivne betydning.

5 Til måling af PG foretrækkes det at bruge et peptid-enzym-konjugat som kan vindes ved kobling af et mærkningsenzym til et peptid med den almene formel



10 hvor R^2 og R^3 har de foran angivne betydninger.

Når det stof der skal måles er insulin, foretrækkes det at bruge et peptid-enzymkonjugat som kan vindes ved kobling af et mærkningsenzym til et peptid med den almene formel



15 hvor R^4 og R^5 har de foran angivne betydninger.

20 Mærkningsenzymet er hensigtsmæssigt et enzym som er stabilt og har høj specifik aktivitet. Som eksempel herpå kan nævnes (1) karbohydraser såsom glykosidaser (fx β -galaktosidase, β -glukosidase, β -glukuronidase, β -fruktosidase, α -galaktosidase, α -glukosidase, α -mannosidase), amylaser, fx α -amylase, β -amylase, isoamylase, glucoamylase, Taka-amylase
25 A), cellulaser og lysozym; (2) amidaser (fx urease, asparaginase); (3) esteraser (fx cholinesteraser såsom acetylcholinesterase, fosfataser såsom alkalisk fosfatase), sulfataser og lipaser); (4) nukleaser såsom desoxyribonuklease, ribonuklease; (5) jern-prophyrin-enzymmer såsom catalase, peroxydase, cytokrom-oxydase; (6) kobberenzymmer såsom tyrosinase, askorbinsyreoxydase; og (7) dehydrogenaser såsom alkoholdehydrogenase, æblesyredehydrogenase, mælkesyredehydrogenase, isocitronsyredehydrogenase.

35 Ved fremstilling af et peptid-mærkningsenzym-konjugat til brug i den foreliggende EIA kan man bruge de substituerbare grupper såsom amino-, karboxyl-, hydroxy- og sulfhydrylgrupper der er til stede i peptidernes aminosyreenhe-

der samt mærkningsenzymmer. Disse substituentter, som forekommer i peptiderne og mærkningsenzymmerne, aktivéres ved behandling med fx kondensationsmidler og binder sig til de reaktive substituerbare grupper i det andet materiale til
5 dannelselse af tværbindinger.

Koblingsreaktionen af et peptid med et mærkningsenzym kan udføres i nærværelse af et hvilket som helst kondensationsmiddel der vides at være nyttigt til kobling af peptider med enzymer. Fx kan der bruges (1) vandopløselige karbodiimidreagenser såsom ECDI og CMCT, der er i stand til at bevirke
10 en dehydrativ kondensation af den reaktive aminogruppe enten i peptidet eller i enzymet med den reaktive karboxylgruppe på det andet materiale i et vandigt opløsningsmiddel; (2) maleimido-N-hydroxysuccinimid-estere såsom m-MBHS og p-MCHS,
15 der inducerer en reaktion af peptidets reaktive aminogruppe med den aktive N-hydroxysuccinimidester til dannelselse af et maleimid, og derefter inducere en reaktion med enzymets sulfhydrylgruppe; og (3) dialdehydreagenser såsom succindialdehyd og GLA som inducerer en binding af den reaktive aminogruppe på enten peptidet eller enzymet med den reaktive aminogruppe
20 i det andet af disse to materialer.

Koblingsreaktionen kan udføres i vandigt opløsningsmiddel, der kan udvælges blandt de opløsningsmidler der vides at være nyttige til peptid-enzym-kondensation. Eksempler herpå er fosfatpuffer mellem pH 6 og 8 og boratpuffer mellem
25 pH 7 og 9.

Reaktionstiden for denne peptid-enzym-kobling er normalt 30 minutter til 20 timer, men i betragtning af enzymernes stabilitet er en kort varighed på 30 minutter til 3 timer
30 ønskelig. Når koblingsreaktionen imidlertid udføres ved lav temperatur kan reaktionstiden uden risiko være så lang som 2-4 døgn. I almindelighed er reaktionstemperaturen fra ca. 4 til ca. 50°C og fortrinsvis omkring 15 til 30°C.

Efter denne ovennævnte koblingsreaktion renses det
35 resulterende peptid-enzym-konjugat og isoleres ved søjlekromatografi under anvendelse af et gelmedium såsom "Sephadex"® G100 eller G200, eller "Sephacrose"® 6B eller 4B.

β -Galaktosidase, forkortet β -Gal, et enzym der hydrolyserer laktose til galaktose og bruges mod en sygdom fremkaldt af laktase-deficiens og som mærkningsenzym i EIA, kan til brug i EIA ifølge opfindelsen være af en hvilken som helst oprindelse, men det foretrækkes i almindelighed at bruge et β -Gal stammende fra *Escherichia coli*, et β -Gal der er let tilgængeligt og har høj specifik aktivitet over for syntetiske substrater såsom o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid og 4-metylbelliferyl- β -D-galaktopyranosid.

10 β -Gal kan bruges i isoleret tilstand eller i en form konjugeret med et immunaktivt materiale. Det immunaktive materiale kan fx være et antigen, antistof eller haptener såsom lægemidler. Som eksempler på antigener kan nævnes hormoner (fx pancreatisk glukagon (PG), dets fragmentpeptider, 15 såsom peptider med formel III, insulin, dets fragmentpeptider såsom peptider med formel II, parathyroidhormon, calcitonin, adrenocorticoid-hormoner, væksthormonet, humant chorio-gonadotropin (hCG) og dets fragmentpeptider såsom peptider med formel I, luteiniseringshormonet, eller det thyroide-stimulerende hormon); 20 proteiner såsom IgG, immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin E (IgE), α -fetoprotein-carcinoembryonisk antigen; virusantigener såsom rubella virus HA-antigen og sendai virus HA-antigen. Som eksempler på antistoffer 25 kan nævnes de antistoffer (anti-PG-antistof, anti-hCG-antistof, anti-IgG-antistof, anti-IgM-antistof og anti-IgE-antistof) der kan vindes ved immunisering af pattedyr såsom karnin, rotte, marsvin, får, ged eller lignende, eller en fugleart såsom høne, and eller gås, med haptener, som er nævnt 30 nedenfor, i overensstemmelse med velkendt procedure. Som haptener kan der nævnes steroider, vitaminer, catecholaminer, antibiotika og andre lægemidler såsom penicilliner, cephalosporiner og β -adrenerge lægemidler.

35 Konjugeringen af β -Gal med et immunaktivt materiale kan ske ved covalent binding. Konjugeringen af disse komponenter kan fx udføres ved den fremgangsmåde der er beskrevet i *Clinica Acta* 81, 1 (1977); eller en metode som består i tværbinding af sulfhydrylgruppen i β -Gal med aminogruppen i et

immunaktivt materiale ved hjælp af m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid; en fremgangsmåde som består i tværbinding af sulfhydrylgruppen i β -Gal med sulfhydrylgruppen i et immunaktivt materiale ved hjælp af O,O-fenylene-dimaleimid; en
5 fremgangsmåde som består i tværbinding af aminogruppen i β -Gal med aminogruppen i et immunaktivt materiale ved hjælp af glutaraldehyd; og en fremgangsmåde som består i kondensation af aminogruppen eller karboxylgruppen i β -Gal med karboxylgruppen eller aminogruppen i et immunaktivt materiale ved
10 hjælp af karbodiimid.

Som eksempler på sukker der anvendes ved udøvelse af den foreliggende opfindelse kan nævnes pentoser såsom arabinose, xylose og ribose; hexoser som fx glukose, fruktose, mannose, galaktose og rhamnose; disakkarider såsom maltose,
15 cellobiose, trehalose, gentiobiose, laktose og sakkarose og trisakkaroser som fx raffinose og maltotriose. Som eksempler på anvendelige sukkeralkoholer skal nævnes monosakkarider med 5 kulstofatomer såsom xylitol og monosakkarider med 6 kulstofatomer som fx sorbitol, mannitol og inositol. Særlig foretrækkes arabinose, mannitol, inositol, sakkarose og raffinose og
20 i særlig grad sakkarose. De ovennævnte sukkere og sukkeralkoholer kan bruges i form af blandinger.

De β -Gal-holdige vandige præparater kan desuden indeholde albumin foruden nævnte sukker og/eller
25 sukkeralkohol og kan ydermere indeholde magnesium- eller/og kalciumion-donorer eller prækursorer. Når man lader den eller disse yderligere komponenter være til stede i præparatet, bidrager man til at forhindre nedsættelse af enzymatisk aktivitet under lyofiliseringen, og i tilfælde af et konjugat af
30 β -Gal og et immunaktivt materiale forhindrer man nedgang i den immunologiske aktivitet, hvortil kommer den virkning at man bidrager til forbedret facon af lyofilisatet. Som eksempler på ovennævnte albumin kan nævnes sådanne serumalbuminer som humanserumalbumin, hesteserumalbumin, okseserumalbumin
35 og fåreserumalbumin, men okseserumalbumin foretrækkes. De ovennævnte magnesium- og/eller kalciumiondonorer eller -prækursorer kan være alle mulige forbindelser med evne til at frigive magnesiumioner og/eller kalciumioner, men magnesiumsalte og

kalciumsalte kan normalt anvendes. Det foretrækkes at bruge magnesiumklorid og calciumklorid.

I vandige præparater er indholdet af β -Gal en mængde svarende til 10 pg til 1 mg (eller 0,3 mikroenheder til 30 millienheder) pr. ml præparat, og fortrinsvis 100 pg til 10 μ g (eller 3 mikroenheder til 0,3 millienheder), regnet på samme basis. Indholdet af sukker eller sukkeralkohol er sædvanligvis ækvivalent med en koncentration på 0,01-20% v/r (vægt/rumfang, dvs. med et forhold mellem enheder af fast stof og væske som mellem g og ml) i det vandige præparat og fortrinsvis 0,2-5% v/r på samme basis. Indholdet af albumin svarer i almindelighed til en koncentration på 0,01-5% v/r og fortrinsvis 0,1-1% v/r i det vandige præparat. Koncentrationen af nævnte magnesium- eller/og calciumiondonorer i det vandige præparat er 0,0001-0,1 M/l og fortrinsvis 0,0001-0,01 M/l.

Ved fremstilling af det vandige præparat er rækkefølgen af tilsætningen af komponenterne ikke kritisk.

Det frysetørrede materiale fremstilles ved lyofilisering af ovennævnte vandige præparat ved omkring -30°C til -50°C , hvorefter man fjerner isen ved sublimering under nedsat tryk ved en temperatur på omkring $10-20^{\circ}\text{C}$ på konventionel måde. Efter denne frysetørningsproces sker der fortrinsvis hermetisk tillukning under nitrogengas eller vakuum for at forhindre ødelæggelse og nedbrydning på grund af sådanne mikroorganismer som svampe og bakterier. Nitrogengas-lukningen udføres i almindelighed ved at man skyller lyofilisatet i tilstrækkelig grad med gasformig nitrogen og lukker hermetisk under nitrogenatmosfære. Vakuumlukningen sker i almindelighed ved at man indelukker lyofilisatet hermetisk under nedsat tryk, fx $10-0,01$ mm Hg.

Det resulterende frysetørrede materiale, vundet ved frysetørring af det vandige præparat indeholdende β -Gal og en sukker eller en sukkeralkohol er meget nyttigt som prøveregens fordi den enzymatiske aktivitet af β -Gal i det væsentlige er bevaret intakt. Det er nyttigt som diagnostisk middel,

og er på grund af dets forholdsvis lave pris og høje specifikke aktivitet værdifuldt som reagens for EIA.

Ved bestemmelse af hCG ved immunbestemmelsesmetoden ifølge den foreliggende opfindelse, anvender man fortrinsvis et humant chorio-gonadotropin-EIA-prøvesæt indeholdende nedenstående materialer.

Prøvesættet under anvendelse af det andet uopløselige antistof indeholder:

- 1) Den del af et antihumant gonadotropin-antistof, isoleret ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som binder en given mængde, fortrinsvis 5-100%, af peptid-enzym-konjugatet og sat til reaktionssystemet;
- 2) en given mængde, fortrinsvis en portion med en enzymatisk aktivitet på 0,1-500 μ E, af det eventuelt frysetørrede peptid-enzym-konjugat;
- 3) fra 0-500 IE standard humant chorio-gonadotropin;
- 4) en pufferopløsning, fortrinsvis en fosfatpuffer med pH 6-9, der bruges til fortynding af ovennævnte reagenser 1) til 3) og den til bestemmelse værende prøvevæske;
- 5) en given mængde, tilstrækkelig til at binde hele mængden af det første antistof 1), af et uopløseligt anti-dyr IgG-bærerkonjugat (idet bæreren kan være en af dem der er nævnt foran);
- 6) en given mængde, fortrinsvis 1-100 μ g, substrat;
- 7) en pufferopløsning, fortrinsvis en fosfatpuffer eller karbonatpuffer, der bruges til vask af det andet antistof-bærer-konjugat 5) og opløsning af substratet 6),
- 8) en pufferopløsning, fortrinsvis en karbonatpuffer eller en tynd vandig opløsning af natriumhydroxyd, der bruges til afslutning af den enzymatiske reaktion.

Dette prøvesæt bruges fortrinsvis på følgende måde:

Til 10-300 μ l reagens 1) sættes der 100-500 μ l reagens 4) og 5-100 μ l af en standard humant chorio-gonadotropin eller prøvevæsken, efterfulgt af tilsætning af 10-300 μ l reagens 2). Blandingen får lov til at reagere ved 0-40°C i 1-72 timer. Derefter, med tilsætning af en given mængde reagens 5), omrøres systemet godt og reagerer yderligere ved 0-40°C i 0,5-24 timer. Efter denne reaktion vaskes det andet antistof-bærer-konjugat med reagens 7) og derefter tilsættes der 10-1000 μ l reagens 6) for at igangsætte en enzymatisk reaktion. Reaktionen gennemføres ved 20-40°C i 0,5-24 timer, og ved afslutningen af denne periode bringes reaktionen til afslutning ved tilsætning af 1-5 ml reagens 8). Absorbensen eller fluorescensintensiteten af reaktionssystemet måles for at bedømme koncentrationen af humant chorio-gonadotropin i prøvevæsken.

I sammenligning med de konventionelle metoder til fremstilling af et specifikt anti-hCG-antistof indebærer fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse ikke nogen kompliceret procedure til fremstilling af immunogenet, men giver et højfølsomt og specifikt antistof på bekvem måde.

Desuden giver i sammenligning med de konventionelle metoder til opdagelse af hCG enzym-immunbestemmelse ifølge den foreliggende opfindelse meget specifikke resultater og er meget praktisk i den henseende at den er fri for interferens fra ledsagende hLH, hFSH og hTSH i prøvevæskerne. Metodens følsomhed er høj nok til at gøre den anvendelig til tidlig diagnose og til prognostisk behandling af chorio-carcinomer og andre sygdomme. EIA i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse er således praktiserbar selv i et klinisk laboratorium hvor man ikke let kan udnytte radioaktive isotoper (i det følgende for korthedens skyld betegnet RI), og den foreliggende fremgangsmåde tillader også bekvem og specifik bestemmelse af serum-hCG-titere. I modsætning til RI-mærkede peptider, der uundgåeligt har halveringstider, er det beskrevne peptid-enzym-konjugat stabilt og kan let fremstilles, hvorfor det kan anvendes med held på et stort antal prøver og giver resultater med høj grad af reproducerbarhed.

I nærværende beskrivelse er forkortelser, der bruges om aminosyrer, peptider, beskyttelsesgrupper, aktive grupper etc. enten de forkortelser der er angivet af IUPAC-IUB Commission on Biological Nomenclature, eller de forkortelser der almindeligt anvendes på dette tekniske område. I det følgende anføres en partiel liste over de anvendte forkortelser. Det vil forstås at når der for aminosyrers og andre forbindelsers vedkommende eksisterer optiske isomerer, så menes der L-formen med mindre andet er angivet.

10	Ala:	alanin
	Pro:	prolin
	Ser:	serin
	Leu:	leucin
	Arg:	arginin
15	Gly:	glycin
	Asp:	asparaginsyre
	Thr:	threonin
	Ile:	isoleucin
	Gln:	glutamin
20	Glu:	glutaminsyre
	Tyr:	tyrosin
	Met:	methionin
	Nle:	norleucin
	Phe:	fenylalanin
25	Val:	valin
	Trp:	tryptofan
	Asn:	asparagin
	Lys:	lysin
	His:	histidin
30	Z:	benzyloxykarbonyl
	OBu ^t :	t-butylester
	HONB:	N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximid
	ONB:	N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidester
	DMF:	N,N'-dimetylformamid
35	DCC:	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid

	DMSO:	dimetylsulfoxyd
	THF:	tetrahydrofuran
	HOBt:	1-hydroxybenzotriazol
	OSu:	N-hydroxysuccinimidester
5	ECDI:	1-etyl-3-(3-dimetylamino-propyl)-karbodiimid
	CMCT:	1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoetyl)-karbodiimid- metho-p-toluensulfonat
	GLA:	glutaraldehyd
	m-MBHS:	meta-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
10	p-MCHS:	para-maleimidometylcyklohexan-1-karboxyl-N- hydroxysuccinimidester

Nogle eksempler og referenceeksempler tjener til nærmere belysning af opfindelsen.

I de anførte referenceeksempler udførtes tyndlagskromatografi ved hjælp af en silikagelplade 60F₂₅₄ fra "Merck"® og følgende elueringsmidler:

	Rf ¹ :	kloroform/metanol 95:5
	Rf ² :	kloroform/metanol/eddikesyre 9:1:0,5
	Rf ³ :	etylacetat/pyridin/eddikesyre/vand 60:20:6:10
20	Rf ⁴ :	n-butanol/pyridin/eddikesyre/vand 30:20:6:24
	Rf ⁵ :	etylacetat/n-butanol/eddikesyre/vand 1:1:1:1
	Rf ⁶ :	n-butanol/eddikesyre/vand 12:3:5

Referenceeksempel 1

H-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH (i det følgende benævnt peptid I; det C-terminale fragmentpeptid af hCG-β (123-145))

a) Z-Pro-Gln-OBu^t

12,5 g Z-Gln-OBu^t opløses i 500 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 300 ml etylacetat. Til denne opløsning sættes der 200 ml af en opløsning i etylacetat af Z-Pro-ONB (fremstillet ud fra 9,7 g Z-Pro-OH, 8,4 g HONB og 8,8 g DCC), og blandingen omrøres i 5 timer. Reaktionsblandingen vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og

vand i nævnte rækkefølge, hvorefter der tørres over vandfrit natriumsulfat. Ætylacetatet afdestilleres derefter og remanensen krystalliseres ved tilsætning af petroleumsæter og en ringe mængde diætylæter og omkrystalliseres yderligere fra samme opløsningsmiddelsystem.

Udbytte 13,1 g (81,5%), smp. 86-88°C, $[\alpha]_D^{26} = -64,8^\circ$
(c = 0,5 i metanol), Rf^1 0,42, Rf^2 0,73.

Beregnet for $C_{22}H_{31}O_6N_3$: C 60,95 H 7,21 N 9,69

Fundet: C 61,04 H 7,20 N 9,49%.

10 b) Z-Leu-Pro-Gln-OBu^t

I 500 ml metanol opløses der 13 g Z-Pro-Gln-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med anvendelse af palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 300 ml ætylacetat. Til denne opløsning sættes der en ætylacetatopløsning af Z-Leu-ONB (fremstillet ud fra 7,9 g Z-Leu-OH, 6,5 g HONB og 6,8 g DCC), og blandingen omrøres i 5 timer. Reaktionsblandingen vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge, hvorefter der tørres over vandfrit natriumsulfat og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen behandles med petroleumsæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 10,6 g (66,2%), smp. 74-77°C, $[\alpha]_D^{23} = -81,4^\circ$
(c = 0,6 i metanol), $Rf^1 = 0,38$, $Rf^2 = 0,66$.

25 Beregnet for $C_{28}H_{42}O_7N_4$: C 61,52 H 7,74 N 10,25

Fundet: C 61,61 H 7,94 N 9,92%.

c) Z-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

Der opløses 10,6 g Z-Leu-Pro-Gln-OBu^t i 500 ml metanol, og der udføres katalytisk reduktion med palladium sort som katalysator. Metanolen afdestilleres og remanensen opløses i 300 ml ætylacetat. Til denne opløsning sættes der 200 ml af en opløsning af Z-Ile-ONB (fremstillet ud fra 5,1 g Z-Ile-OH, 4,2 g HONB og 4,4 g DCC) i ætylacetat/dioxan 1:1, og blandingen omrøres i 16 timer. Opløsningsmidlet fjernes fra reaktionsblandingen ved destillation og remanensen opløses i 400 ml ætylacetat. Reaktionsblandingen vaskes med 0,2N HCl, 4% van-

digt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge, efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat. Opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen behandles med petroleumssæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

- 5 Udbytte 12,1 g (94,5%), smp. 78-80°C (sønderdeling),
 $[\alpha]_D^{23} = -87,0^\circ$ (c = 0,42 i metanol), $Rf^1 = 0,23$, $Rf^2 = 0,67$.
 Beregnet for $C_{34}H_{53}O_8N_5$: C 61,89 H 8,10 N 10,62
 Fundet: C 62,35 H 8,31 N 10,16%.

d) Z-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

- 10 12 g Z-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t opløses i 500 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion i hydrogenstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 100 ml DMF, der tilsættes 4,7 g Z-Pro-OH og 3,0 g HOBt, blandingen afkøles til 0°C og der tilsættes yderligere 4,3 g DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og derefter ved stuetemperatur i 10 timer. Bundfaldet frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 400 ml ætylacetat. Opløsningen vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge, hvorefter der tørres over vandfrit natriumsulfat. Opløsningsmidlet afdestilleres og der tilsættes diætylæter til remanensen hvorpå blandingen opvarmes. Efter fjernelse af den ovenstående væske behandles remanensen med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.
- 15
20
25

Udbytte 12,6 g (91,5%), smp. 83-87°C (sønderdeling).
 $[\alpha]_D^{23} = -121,0^\circ$ (c = 0,5 i metanol), $Rf^1 = 0,31$, $Rf^2 = 0,84$.
 Beregnet for $C_{39}H_{60}O_9N_6$: C 61,88 H 7,99 N 11,10
 Fundet: C 62,04 H 8,21 N 10,70%.

30 e) Z-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

- I 500 ml metanol opløses der 12,5 g Z-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogenstrøm med anvendelse af palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 100 ml DMF. Til denne opløsning sættes der 4,2 g Z-Thr-OH og 2,7 g HOBt og opløsningen afkøles til
- 35

0°C. Derefter tilsættes 3,7 g DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 8 timer. Bundfaldet frafilteres. Efter fjernelse af opløsningsmidlet ved destillation ekstraheres remanensen med 400 ml ætylacetat og ekstrakten vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge, efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat. Opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen behandles med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

10 Udbytte 11,8 g (86,8%), smp. 101-105°C, $[\alpha]_D^{23} = -124,3^\circ$ (c = 0,58 i metanol), $Rf^1 = 0,20$, $Rf^2 = 0,68$.
 Beregnet for $C_{42}H_{67}O_{11}N_7$: C 60,19 H 7,87 N 11,43
 Fundet: C 59,54 H 7,91 N 11,19%.

f) Z-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

15 11,8 g Z-Thr.Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t opløses i 500 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafilteres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 100 ml DMF. I denne opløsning opløses der 4,5 g Z-Asp(OBu^t)-OH og 2,3 g HOBt og opløsningen afkøles til 0°C. Derpå tilsættes der 3,2 g DCC, blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 10 timer, bundfaldet frafilteres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen behandles med 150 ml ætylacetat og det resulterende gelagtige bundfald opsamles ved filtrering, krystalliseres fra ætylacetat/diætylæter og opsamles ved filtrering med diætylæter.

20 Udbytte 12,15 g (85,9%), smp. 94-96°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{21} = -109,1^\circ$ (c = 0,59 i metanol), $Rf^1 = 0,13$, $Rf^2 = 0,47$.
 Beregnet for $C_{51}H_{80}O_{14}N_8 \cdot H_2O$: C 58,49 H 7,89 N 10,70
 30 Fundet: C 58,60 H 8,07 N 10,71%.

g) Z-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

I 500 ml metanol opløses der 12 g Z-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafilteres, opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen opløses i 100 ml DMF sammen med 2,93 g Z-Ser-OH og

2,0 g HOBt. Opløsningen afkøles til 0°C efterfulgt af tilsætning af 2,8 g DCC, og blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og derpå ved stuetemperatur i 12 timer. Bundfaldet frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 500 ml ætylacetat. Opløsningen vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat, og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen behandles med ætylacetat og diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 11,7 g (90,0%), smp. 111-115°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{21} = -112,3^\circ$ (c = 0,63 i metanol), $Rf^1 = 0,06$, $Rf^2 = 0,31$.

Beregnet for $C_{54}H_{85}O_{16}N_9, H_2O$: C 57,17 H 7,73 N 11,11
 Fundet: C 57,34 H 7,77 N 11,14%.

h) Z-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

11,6 g Z-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t opløses i 500 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Sammen med 4,3 g Z-Pro-OBN opløses remanensen i 100 ml DMF og opløsningen omrøres ved stuetemperatur i 16 timer. Opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen ekstraheres med 500 ml ætylacetat og ekstrakten vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge. Efter tørring over vandfrit natriumsulfat afdestilleres opløsningsmidlet. Remanensen behandles med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 11,1 g (88,1%), smp. 117-120°C, $[\alpha]_D^{21} = -119,2^\circ$ (c = 0,61 i metanol), $Rf^2 = 0,45$.

Beregnet for $C_{59}H_{92}O_{17}N_{10}, H_2O$: C 57,54 H 7,69 N 11,38
 Fundet: C 57,44 H 7,69 N 11,38%.

i) Z-Gly-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

Der opløses 10 g Z-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t i 500 ml metanol og foretages katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator.

Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses sammen med 4 g Z-Gly-ONB i 80 ml DMF og blandingen omrøres ved stuetemperatur i 12 timer. Opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen opløses i 500 ml ætylacetat og opløsningen vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge. Efter tørring over vandfrit natriumsulfat afdestilleres opløsningsmidlet. Remanensen opløses i 180 ml metanol efterfulgt af tilsætning af 4,5 ml hydrazinhydrat, blandingen omrøres ved stuetemperatur i 16 timer og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 500 ml ætylacetat, opløsningen vaskes med vand efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen behandles med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 7,35 g (70,2%), smp. 131-135°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -119,4^\circ$ (c = 0,35 i metanol), $R_f^2 = 0,27$.
 Beregnet for $C_{61}H_{95}O_{18}N_{11}, H_2O$: C 56,86 H 7,59 N 11,96
 Fundet: C 56,65 H 7,68 N 12,02%.

j) Z-Leu-Pro-OBu^t

I 800 ml metanol opløses der 20,2 g Z-Pro-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 300 ml ætylacetat efterfulgt af tilsætning af 26,3 g Z-Leu-OSu og blandingen omrøres i 16 timer. Reaktionsblandingen vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge hvorefter der sker tørring over vandfrit natriumsulfat og opløsningsmidlet afdestilleres til frembringelse af et olieagtigt produkt.

Udbytte 27,6 g (100%), $R_f^1 = 0,71$, $R_f^2 = 0,78$.

k) Z-Arg(NO₂)-Leu-Pro-OBu^t

13,8 g Z-Leu-Pro-OBu^t opløses i 500 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses sammen med 11,7 g Z-Arg(NO₂)-OH og 6,7 g HOBt i 200 ml DMF og opløsningen

afkøles til 0°C. Derpå tilsættes 7,5 DCC, blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og derpå ved stuetemperatur i 12 timer, bundfaldet frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen ekstraheres med 600 ml ætylacetat, ekstrakten vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge og tørres over vandfrit natriumsulfat hvorpå opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen henstår og de resulterende krystaller behandles med diætylater. Remanensen opsamles ved filtrering og omkrystalliseres fra metanol.

Udbytte 12,4 g (60,6%), smp. 170-172°C, $[\alpha]_D^{26} = -67,8^\circ$ (c = 0,48 i metanol), $Rf^3 = 0,77$.

Beregnet for $C_{29}H_{45}O_8N_7$: C 56,20 H 7,32 N 15,82

Fundet: C 55,79 H 7,16 N 15,85%.

15 1) Z-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t

I 500 ml metanol opløses der 12,3 g Z-Arg(NO₂)-Leu-Pro-OBu^t efterfulgt af tilsætning af 6,6 ml 6N HCl, og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses sammen med 2,8 ml triætylamin i 100 ml DMF og triætylamin-hydrokloridet frafiltreres. Til filtratet sættes der 4,8 g Z-Ser-OH og 5,4 g HONB og blandingen afkøles til 0°C. Derpå tilsættes der 4,95 g DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 16 timer. Bundfaldet frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen ekstraheres med 500 ml ætylacetat. Ekstrakten vaskes godt med mættet vandigt natriumklorid efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat, og opløsningsmidlet afdestilleres til frembringelse af en sirupsagtig remanens. $Rf^3 = 0,53$.

m) Z-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t

I 500 ml metanol opløses der 10,5 g Z-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t og 3 ml 6N HCl og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen opløses i 100 ml DMF og opløsningen neutraliseres med

2,52 ml trietylamin. Trietylamin-hydrokloridet frafiltreres og derefter tilsættes 8,4 g Z-Pro-ONB hvorpå blandingen omrøres ved stuetemperatur i 16 timer. Opløsningsmidlet afdestilleres, der sættes 300 ml ætylacetat og 300 ml mættet vandigt natriumklorid til remanensen og blandingen rystes grundigt. Reaktionsblandingen henstår, der udvindes et olieagtigt bundfald fra det vandige lag og derpå tilsættes der dietyl-
 5 æter. Det resulterende pulver opløses i metanol, de uopløselige stoffer frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen behandles yderligere med dietylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 8,45 g (70,8%), smp. 115-120°C (sønderdeling),
 $[\alpha]_D^{22} = -84,7^\circ$ (c = 0,53 i metanol), $Rf^3 = 0,41$.
 Beregnet for $C_{37}H_{58}O_9N_8, HCl, H_2O$: C 54,63 H 7,56 N 13,78 Cl 4,36
 15 Fundet: C 54,50 H 7,70 N 14,11 Cl 4,21%.

n) Z-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t

I 200 ml metanol opløses der 3,8 g Z-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 30 ml DMF. Til denne opløsning sættes der en opløsning (10 ml) af Z-Ser-ONB (fremstillet ud fra 1,37 g Z-Ser-OH, 1,24 g HONB og 1,30 g DCC) i DMF, og blandingen omrøres ved stuetemperatur i 16 timer. Bundfaldet frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses ved tilsætning af 1 ml ætylacetat og 1 ml acetonitril og derefter behandles opløsningen med æter og det resulterende pulver udvindes ved filtrering. Dette pulver opløses i 2 ml af en 1:1 blanding af opløsningsmiddel Rf^3 og ætylacetat, påføres på en kolonne (5,6 x 9,0 cm) pakket med silikagel under anvendelse af samme opløsningsmiddel, og der fremkaldes med samme opløsningsmiddel. Fraktionerne fra 365 ml til 746 ml forenes, opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen behandles med dietylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 2,12 g (50,2%), smp. 130-135°C (sønderdeling),
 35 $[\alpha]_D^{22} = -83,5^\circ$ (c = 0,38 i metanol), $Rf^3 = 0,34$.

Beregnet for $C_{40}H_{63}O_{11}N_9, HCl, H_2O$: C 53,35 H 7,39 N 14,00 Cl 3,94
 Fundet: C 53,67 H 7,45 N 13,72 Cl 3,52%.

o) Z-Ser-Leu-Pro-OBu^t

13,8 g Z-Leu-Pro-OBu^t opløses i 700 ml metanol og der
 5 udføres katalytisk reduktion i en hydrogenstrøm med palla-
 dium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og op-
 løsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses sammen med
 7,9 g Z-Ser-OH og 8,9 g HONB i 200 ml acetonitril og opløsning-
 10 den afkøles til 0°C. Derpå tilsættes der 7,5 g DCC og blan-
 dingen omrøres ved 0°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 16
 timer. Bundfaldet frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres
 og remanensen ekstraheres med 500 ml ætylacetat. Ekstrakten
 vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og
 vand i nævnte rækkefølge, efterfulgt af tørring over vandfrit
 15 natriumsulfat, hvorpå opløsningsmidlet afdestilleres og giver
 17 g af en olie. Denne olie opløses i 15 ml kloroform/metanol
 200:3 og påføres en kolonne på 5,4 x 20 cm, pakket med silika-
 gel og med samme opløsningsmiddel, og der fremkaldes med samme
 opløsningsmiddel. Fraktionerne fra 1300 til 2100 ml forenes
 20 og opløsningsmidlet afdestilleres så der fremkommer et olieag-
 tigt produkt.

Udbytte 12,2 g (73,1%), $Rf^1 = 0,38$, $Rf^2 = 0,69$.

p) Z-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t

1,0 g Z-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t og 1,2 ml 1N HCl
 25 opløses i 60 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion
 i en hydrogenstrøm med palladium sort som katalysator. Ka-
 talysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og
 remanensen opløses i 20 ml DMF. Derefter opløses der 700 mg
 Z-Ser-Leu-Pro-OBu^t i 7 ml trifluoredikesyre og efter 50 minut-
 30 ter afdestilleres opløsningsmidlet. Remanensen vaskes med en
 blanding af diætylæter/petroleumsæter 1:2, vaskevæskerne kas-
 seres og den olieagtige remanens tørres under nedsat tryk med
 en vakuumpumpe til frembringelse af et pulver. Pulveret oplø-
 ses straks i ovennævnte DMF-opløsning sammen med 407 mg HONB.
 35 Derpå tilsættes der ved 0°C 466 mg DCC og blandingen omrøres
 ved 0°C i 6 timer og derpå ved stuetemperatur i 16 timer.

Bundfaldet frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 5 ml opløsningsmiddel Rf³/ætylacetat 4:1 og anbringes på en kolonne (3,6 x 9,0 cm) pakket med sili-
 5 kagel og med anvendelse af samme opløsningsmiddel, hvorpå der elueres med samme opløsningsmiddel. Fraktionerne fra 333 til 572 ml forenes, opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen behandles med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering.

Udbytte 450 mg (33,8%), smp. 110-120°C (sønderdeling),
 10 $[\alpha]_D^{24} = -106,6^\circ$ (c = 0,31 i metanol), Rf⁵ = 0,71

q) Z-Pro-Pro-OBu^t

I 500 ml metanol opløses der 10,1 g Z-Pro-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i hydrogen gas med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmid-
 15 let afdestilleres. Remanensen opløses sammen med 8,47 g Z-Pro-OH og 5,4 g HOBt i 300 ml ætylacetat og opløsningen afkøles til 0°C. Derpå tilsættes der 7,5 g DCC, blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og derpå ved stuetemperatur i 12 ti-
 20 mer og bundfaldet frafiltreres. Filtratet vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat, hvorpå opløsningsmidlet afdestilleres. Den krystallinske remanens behandles med diætylæter og opsamles ved filtrering.

Udbytte 9,85 g (74,1%), smp. 94-96°C, $[\alpha]_D^{22} = -116,9^\circ$
 25 (c = 0,54 i metanol), Rf¹ = 0,58, Rf² = 0,72.

Beregnet for C₂₂H₃₀O₅N₂: C 65,65 H 7,51 N 6,96

Fundet: C 65,42 H 7,38 N 7,20%.

r) Z-Pro-Pro-Pro-OBu^t

9 g Z-Pro-Pro-OBu^t opløses i 300 ml metanol og der udføres
 30 katalytisk reduktion i en hydrogen gasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses sammen med 5,6 g Z-Pro-OH og 3,63 g HOBt i 250 ml ætylacetat og opløsningen afkøles ved 0°C. Derpå tilsættes 5,1 g DCC og blandingen omrøres
 35 ved 0°C i 6 timer og ved stuetemperatur i 16 timer. Bundfaldet frafiltreres. Filtratet vaskes med 0,2N HCl, 4% vandigt

natriumhydrogenkarbonat og vand i nævnte rækkefølge, hvorefter der tørres over vandfrit natriumsulfat og opløsningsmidlet afdestilleres. Den krystallinske remanens behandles med diætylæter og filtreres.

5 Udbytte 9,6 g (85,9%), smp. 135-157°C, $[\alpha]_D^{22} = -176,0^\circ$
(c = 0,55 i metanol), $Rf^1 = 0,40$, $Rf^2 = 0,69$.

Beregnet for $C_{27}H_{37}O_6N_3,1/2H_2O$: C 63,76 H 7,53 N 8,26

Fundet: C 63,77 H 7,53 N 8,62%.

s) Z-Ala-Pro-Pro-Pro-OBu^t

10 I 200 ml metanol opløses der 5 g Z-Pro-Pro-Pro-OBu^t
og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm
med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres
og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses
sammen med 2,23 g Z-Ala-OH og 1,62 g HOBt i 20 ml DMF og op-
15 løsningsmidlet afkøles til 0°C. Til denne opløsning sættes der
2,27 g DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 4 timer og derpå
ved stuetemperatur i 12 timer. Bundfaldet frafiltreres og op-
løsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 3 ml 2%
metanol-kloroform og anbringes på en kolonne (3,7 x 10,5 cm)
20 pakket med silikagel og med hjælp af samme opløsningsmiddel,
og der fremkaldes også ved hjælp af dette. Fraktionerne fra
170 til 380 ml forenes og opløsningsmidlet afdestilleres og
giver 4,05 g (71,0%) olieagtigt produkt. $Rf^1 = 0,32$, $Rf^2 = 0,67$

t) Z-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t

25 I 80 ml metanol opløses der 400 mg Z-Ser-Leu-Pro-Ser-
Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t sammen med 0,8 ml 1N HCl og der udfø-
res katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium
sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsnings-
midlet afdestilleres. Remanensen opløses i 10 ml DMF, opløs-
30 ningen neutraliseres med 0,11 ml triætylamin og triætylamin-
hydrokloridet frafiltreres. 233 mg Z-Ala-Pro-Pro-Pro-OBu^t op-
løses i 2 ml trifluoreddikesyre og efter 50 minutter afdestil-
leres opløsningsmidlet. Til remanensen sættes der diætylæter
og det resulterende pulver opsamles ved filtrering og tørres.
35 Pulveret opløses sammen med 122 mg HONB i ovennævnte DMF-op-
løsning og opløsningen afkøles til 0°C. Til denne opløsning

sættes der 140 ml DCC, blandingen omrøres ved 0°C i 6 timer og derpå ved stuetemperatur i 12 timer. Bundfaldet fjernes ved filtrering og opløsningsmidlet afdestilleres. Til remanensen sættes der diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering og omkrystalliseres fra acetonitril/ætylacetat.

Udbytte 430 mg (82,1%), smp. 152-155°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{24} = -153,6^\circ$ (c = 0,45 i metanol), $Rf^3 = 0,10$, $Rf^5 = 0,54$.

Beregnet for $C_{72}H_{112}O_{19}N_{16}, HCl, H_2O$:

C 55,42 H 7,43 N 14,37 Cl 2,27

10 Fundet:

C 56,21 H 7,54 N 14,04 Cl 2,30%.

u) Z-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t

I 30 ml metanol opløses der 360 mg Z-Gly-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 10 ml DMF. I 3 ml trifluoreddikesyre opløses der 430 mg Z-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t og opløsningen henstår ved stuetemperatur i 45 minutter. Opløsningsmidlet afdestilleres, remanensen behandles med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering og tørres. Pulveret opløses sammen med 103 mg HONB i ovennævnte DMF-opløsning og den blandede opløsning afkøles til 0°C. Derefter tilsættes der 118 mg DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 6 timer og derpå ved stuetemperatur i 40 timer. Bundfaldet frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen behandles med diætylæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering og genudfældes yderligere fra DMF og diætylæter.

Udbytte 700 mg (95,5%), smp. 120-125°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -127,7^\circ$ (c = 0,12 i metanol), $Rf^5 = 0,62$, $Rf^6 = 0,44$.

Beregnet for $C_{121}H_{191}O_{34}N_{27}, HCl, 2H_2O$:

C 53,12 H 7,80 N 14,94 Cl 1,40

Fundet:

C 53,39 H 7,62 N 15,10 Cl 1,54%.

v) H-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH (peptid I)
(det C-terminale fragmentpeptid af hCG- β (123-145))

580 mg Z-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t
 5 og 0,45 ml 1N HCl opløses i 50 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og der sættes 1 ml vand til remanensen, efterfulgt af gendestillation. Remanensen opløses i 10 ml 90% vandig trifluoreddikesyre og henstår ved stuetemperatur i 10 60 minutter. Efter at opløsningsmidlet er afdestilleret opløses remanensen ved tilsætning af 10 ml vand og underkastes søjlekromatografi på "Amberlite"® IRA-410 (acetatformen; kolonnestørrelse 1 x 5 cm). Eluatet opsamles. Harpiksen vaskes godt med 50 ml vand og vaskevæskerne forenes med eluatet og frysetørres til frembringelse af 390 mg hvidt pulver. Dette pulver anbringes på en kolonne (2 x 83 cm) af "Sephadex"® LH-20, pakket med 1N eddikesyre, og fremkaldes med samme opløsningsmiddel. Fraktionerne fra 70 til 100 ml forenes, frysetørres og søjlekromatograferes på samme måde som ovenfor og med samme fremkaldelses-opløsningsmiddel. De fraktioner som indeholder den ønskede forbindelse forenes og frysetørres til et hvidt pulver.

25 Udbytte 185 mg (35,2%), $[\alpha]_D^{23} = -194,5^{\circ}$ (c = 0,13 i 0,1N eddikesyre), $Rf^5 = 0,06$, Rf^4 (cellulose) = 0,78.

Aminosyreanalyse (med beregnet tal i parentes): Arg 1,00 (1), Asp 1,00 (1), Thr 1,00 (1), Ser 3,74 (4), Glu 1,03 (1), Pro 9,59 (9), Gly 0,98 (1), Ala 0,94 (1), Ile 0,95 (1), 30 Leu 2,97 (3). Gennemsnitlig udvindingsmængde: 79,3%.

Referenceeksempel 2

H-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH (i det følgende betegnet peptid II; det C-terminale fragmentpeptid af hCG- β (130-145))

35 Der opløses 2,16 g Z-Gly-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OBu^t i 100 ml metanol og udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator.

Katalysatoren frafiltreres, opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 25 ml DMF. Til denne opløsning sættes der Z-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OH, vundet ved behandling af 1,5 g Z-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-OBu^t med trifluoreddikesyre, samt 1,22 g HONB, hvorefter der afkøles til 0°C. Derefter tilsættes der 701 mg DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 6 timer og ved stuetemperatur i 40 timer. Bundfaldet fjernes ved filtrering og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen udfældes med ætylacetat og diætylæter og filtreres. Bundfaldet opløses i 5 ml opløsningsmiddel Rf³ og anbringes på en silikagelkolonne (5,7 x 9 cm) pakket med nævnte opløsningsmiddel og fremkaldes også med samme opløsningsmiddel. Fraktionerne fra 534 til 914 ml forenes, destilleres til fjernelse af opløsningsmidlet, fældes med diætylæter og filtreres.

Udbytte 1,1 g (33,9%), Rf³ = 0,20.

Derefter opløses en portion på 70 mg af ovennævnte beskyttede peptid i 10 ml metanol og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogengasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen opløses i 1 ml 90% trifluoreddikesyre og efter 60 minutter afdestilleres opløsningsmidlet. Remanensen opløses ved tilsætning af 3 ml vand og underkastes søjlekromatografi på "Amberlite"® IRA-410 (acetatformen; kolonnestørrelse 1 x 1 cm), efterfulgt af frysetørring. Derefter opløses lyofilisatet i 0,5 ml 1N eddikesyre og anbringes på en kolonne af "Sephadex"® LH-20 pakket med 1N eddikesyre og fremkaldes med samme opløsningsmiddel. De fraktioner som indeholder den ønskede forbindelse forenes og frysetørres til et hvidt pulver.

Udbytte 22 mg (36,1%), $[\alpha]_D^{23} = -159,3^{\circ}$ (c = 0,15 i 0,1N eddikesyre), Rf⁵ = 0,15.

Aminosyreanalyse (beregnet): Arg 1,01 (1), Asp 1,01 (1), Thr 0,98 (1), Ser 2,57 (3), Glu 0,96 (1), Pro 4,85 (5), Gly 1,00 (1), Ile 0,96 (1), Leu 2,04 (2), gennemsnitlig udvindingsgrad: 81,1%.

Referenceeksempel 3

 H-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH (i det følgende
 betegnet peptid III; det C-terminale fragmentpeptid af hCG- β
 (136-145))

- 5 150 mg Z-Gly-Pro-Ser-Asp(OBu^t)-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-
 Gln-OBu^t opløses i 2,5 ml 90% trifluoreddikesyre og opløsning-
 gen henstår ved stuetemperatur i 60 minutter. Derefter afde-
 stilleres opløsningsmidlet, remanensen opløses i 30 ml 50%
 eddikesyre og der udføres katalytisk reduktion i en hydrogen-
 10 gasstrøm med palladium sort som katalysator. Katalysatoren
 frafiltreres og opløsningsmidlet afdestilleres. Remanensen op-
 løses i 10 ml vand, underkastes søjlekromatografi på
 "Amberlite" [®] IRA-410 (acetatformen; kolonnestørrelse 1 x 3 cm),
 og harpiksen vaskes godt med vand. Eluatet og vaskevæskerne
 15 forenes og frysetørres. Lyofilisatet anbringes på en kolonne
 (2 x 83 cm) af "Sephadex" [®] LH-20 pakket med 1N eddikesyre,
 og der fremkaldes med nævnte opløsningsmiddel. Fraktionerne
 fra 90 til 105 ml forenes og frysetørres til et hvidt pulver.
 Udbytte 70 mg (57,9%), $[\alpha]_D^{19} = -150,5^\circ$ (c = 0,2 i
 20 0,1N eddikesyre), $Rf^5 = 0,29$, Rf^4 (cellulose) = 0,55.
 Aminosyreanalyse: Asp 1,02 (1), Thr 0,98 (1), Ser 0,92
 (1), Glu 1,04 (1), Pro 3,17 (3), Gly 0,99 (1), Ile 0,99 (1),
 Leu 1,00 (1). Gennemsnitlig udvindingsgrad: 82,6%.

Referenceeksempel 4

25 Anti-hCG-antistof

- I 1 ml fysiologisk saltopløsning opløses der 1 mg hCG
 (ca. 10000 IE/mg), renses fra menneskeurin på den konventionel-
 le måde, og der tilsættes 1 ml af Freund's fuldstændige adju-
 vans (Tachibana et al, Men-eki-no-Seikagaku (Immunitets-bio-
 30 kemi), side 26, Kyoritsu Shuppan Inc., Japan (1967)) og der
 omrørtes godt for at tilberede en emulsion. Denne emulsion in-
 jiceredes i begge sideres lårmuskler og subkutant på flere
 steder af ryggen af en kanin. Denne fremgangsmåde gentoges
 ialt 5 gange med mellemrum på 3 uger, og efter den sidste
 35 immunisering blev der udtaget en blodprøve til pilot-bestemmel-
 se. På denne måde opnåedes et anti-hCG-antistof med kraftig

affinitet til det C-terminale fragmentpeptid af hCG- β /enzym-konjugatet.

Referenceeksempel 5

hCG- β -D-Galaktosidase-konjugat

5 I 1 ml 0,05M fosfatpuffer (pH 7,0) opløstes der 1 mg hCG (ca. 10000 IE/mg) og under omrøring tilsattes der 50 μ l THF indeholdende 78 μ g m-MBHS. Blandingen fik lov til at reagere ved 30°C i 30 minutter hvorefter den straks førtes gennem en kolonne (0,9 x 55 cm) af "Sephadex" [®] G-25 for at fjerne overskydende reagensmængder. Derefter udførtes der eluering
10 med 0,05M citratpuffer (pH 5,5) for at isolere det maleimiderede hCG. Denne maleimiderede hCG-opløsning (2 ml) sættes dråbevis til 0,5 ml af en tynd opløsning (1 mg/ml) af β -D-galaktosidase i 0,05M fosfat-NaCl-puffer (pH 7,5) og reaktionen gennemførtes ved stuetemperatur i 2 timer. Derefter førtes reaktionsblandingen gennem en kolonne på 1 x 15 cm af concanavalins A-"Sepharose" [®] 4B for at adsorbere hCG- β -D-galaktosidase-konjugatet. Der udførtes derpå eluering med 0,05M fosfat-NaCl-puffer indeholdende 0,2M α -metylmannosid (pH 7,5) og de
15 fraktioner der udviste både enzymatisk aktivitet og hCG-immunaktivitet forenedes. Dette aktive eluat rensedes yderligere ved søjlekromatografi på "Sepharose" [®] 6B med 0,02M fosfat-NaCl-puffer (pH 7,0). Den enzymholdige fraktion fraskiltes og gav et hCG-enzym-konjugat.
20

25 Referenceeksempel 6

(1) Anti-hCG- β -C-terminalt fragmentpeptid (123-145) antistof

I 4 ml 0,2M fosfatpuffer (pH 7,3) opløstes der 25 mg af det i referenceeksempel 1 fremstillede fragmentpeptid (hCG- β -C-terminalt fragmentpeptid (123-145)) og 50 mg oksethyroglobulin (forkortes herefter til BTG), efterfulgt af
30 tilsætning af 4 ml 5% vandig opløsning af GLA. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 3 timer, dialyseredes mod vand (2 l x 4) ved 4°C og frysetørredes til frembringelse af et immunogen. 1,5 mg af dette hCG- β -C-terminale fragmentpeptid
35 (123-145)-BTG-konjugat opløstes i 0,75 ml fysiologisk saltop-

løsning og opløsningen blandedes godt med 0,75 ml af Freund's fuldstændige adjuvans til tilberedning af en emulsion. Denne emulsion injiceredes i begge sidens lårmuskler og subkutant på flere steder på kaniners ryg. Denne procedure gentoges ialt 4 gange med mellemrum på 4 uger, og blodet opsamledes 1 uge efter den sidste immunisering og centrifugeredes til fraskillelse af antiserum. På denne måde vandtes anti-hCG- β -C-terminalt fragmentpeptid (123-145)-serum-F5C.

Dette antiserum F5C fældedes med ammoniumsulfat på rutinemæssig måde og gav en γ -globulinfraktion som derefter førtes gennem en kolonne af 2 mg hCG-konjugeret "Sephacrose" [®] 4B (0,9 cm i diameter, 4 cm lang).

Kolonnen vaskedes med 0,02M boratpuffer (pH 8,0) indeholdende 0,15M NaCl, og der udførtes eluering med 0,17M glycin-HCl-puffer (pH 2,3), hvorved der vandtes et anti-hCG- β -C-terminalt fragmentpeptid (123-145) F5CS med høj affinitet til hCG.

(2) Fremstilling af en antistofbundet fast fase

Til 300 polystyrenkugler (diameter 6,4 mm, fra Precision Plastics Ball Co., Chicago, USA) sattes der 50 ml 0,01M fosfatpuffer (pH 7,7) og blandingen opvarmedes til 56°C. Derefter tilsattes der 2 mg F5CS, fremstillet som under afsnit 1), og blandingen inkuberedes ved 56°C i 2 timer. Den vaskedes derpå med 0,05 M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 0,1% BSA, og opbevarede i kulde til brug fandt sted.

(3) Fremstilling af et anti-hCG-antistof- β -Gal-konjugat

I overensstemmelse med den procedure der er beskrevet ovenfor under 1), blev en kanin immuniseret med 1 mg hCG (ca. 10000 IE/mg), rensat fra menneskeurin på den konventionelle måde til fremstilling af et anti-hCG-serum. Dette anti-hCG-serum fældedes fraktioneret med ammoniumsulfat og underkastedes affinitetskromatografi på en kolonne (diameter 0,9 cm, længde 4 cm) af "Sephacrose" [®] 4B, konjugeret med 5 mg hCG- β -C-terminalt fragmentpeptid (123-145). Effluenten udvandedes for at vinde antistof T7CS. 4 mg T7CS opløstes i 2 ml 0,05M fosfatpuffer (pH 7,0) og derefter tilsattes der 200 μ l THF

indeholdende 400 µg m-MBHS. Reaktionen udførtes ved 30°C i 30 minutter. Reaktionsblandingen førtes over "Sephadex"® G-25 (kolonnediameter 0,9 cm, længde 55 cm) ækvilibreret med 0,02M fosfatpuffer for at skille overskydende reagens fra det maleimiderede antistof. Denne maleimiderede antistofopløsning (0,5 ml) sattes gradvist til 0,3 ml af en tynd opløsning (1 mg/ml) af β-D-galaktosidase i 0,02M fosfat-NaCl-puffer (pH 7,5) og reaktionen gennemførtes ved 5°C natten over under lejlighedsvis rystning. Efter reaktionen rensedes blandingen ved søjlekromatografi på "Sepharose"® 6B med 0,02M fosfat-NaCl-puffer (pH 7,0) og de fraktioner der indeholdt enzym- og antistofaktiviteter opsamledes. På denne måde vandtes der et konjugat af anti-hCG-antistof og β-Gal.

Referenceeksempel 7

Fremstilling af peptid I-β-galaktosidase-konjugat

2,3 mg peptid I, fremstillet som i referenceeksempel 1, opløstes i en blanding af 0,5 ml 0,05M fosfatpuffer (pH 7,0) og 0,5 ml DMSO, efterfulgt af tilsætning af 50 µl THF indeholdende 780 µg m-MHBS. Blandingen reagerede ved 30°C i 30 minutter. Reaktionsblandingen førtes gennem en kolonne på 0,9 x 55 cm af "Sephadex"® G-15, ækvilibreret med 0,02M fosfatpuffer for at fraskille overskydende reagenser fra det maleimiderede peptid. Denne maleimiderede peptidopløsning, 0,5 ml, sattes gradvis til 0,5 ml tynd β-D-galaktosidaseopløsning (1 mg/ml) i 0,02M fosfat-NaCl-puffer (pH 7,5), og blandingen reagerede ved 5°C natten over under lejlighedsvis rystning.

Efter at reaktionen var fuldført rensedes blandingen ved kromatografi på en "Sepharose"® 6B kolonne ved hjælp af 0,02M fosfat-NaCl-puffer (pH 7,0) for at fraskille den enzymholdige fraktion, hvorved man vandt det ønskede peptid-enzymkonjugat.

De fysiske egenskaber af det således vundne peptid-enzymkonjugat er som følger.

1) Konjugatet sønderdeler sådanne syntetiske substrater anvendt i EIA som O-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid og 4-metylbulliferyl-β-D-galaktopyranosid til frigivelse af henholdsvis O-nitrofenol og 4-metylbulliferon.

- 2) Når der anvendes det syntetiske substrat 4-metyllumbelliferyl- β -D-galaktopyranosid, er konjugatets Michaelis-konstand lig med den for den intakte β -D-galaktosidase.
- 3) Den optimale pH-værdi for enzymatisk aktivitet er 6,5 til 7,3.
- 5 4) Mere end 90% af dette enzymatisk aktive konjugat er reaktivt over for anti-hCG-antistof, og dets immunologiske aktivitet såvel som dets enzymatiske aktivitet er stabile i over 4 måneder under køleskabsbetingelser.
- 5) Konjugatets molekylvægt er ca. 550000 og dets forhold mellem molært peptid I og enzym er ca. 7.
- 10 6) Det er letopløseligt i vandigt medium mellem pH 5 og pH 9.
- 7) Fig. 2 viser det ultraviolette absorptionsspektrum for peptid I- β -galaktosidase-konjugat; absorptionsmaximum ca. 15 280 nm.
- 8) Nedenstående tabel 2 viser konjugatets aminosyresammensætning.
- 9) Andre egenskaber af dette konjugat er identisk med den for β -D-galaktosidase (Boyer "The Enzymes", Vol. 7 (1972), 20 side 617, Academic Press, New York-London).

Tabel 2

Aminosyre	Antal mol af hver aminosyre i peptid I- β -D-galaktosidase-konjugat pr. 100 mol glycin
25 Lys	31
His	51
Arg	94
Asp	153
Thr	77
30 Ser	80
Glu	159
Pro	99
Gly	100
Ala	109
35 Val	88
Met	19
Ile	60
Leu	139
Tyr	34
Phe	55

Referenceeksempel 8
-----Fremstilling af peptid II- β -D-galaktosidase-konjugat

5 Fremgangsmåden i referenceeksempel 7 gentoges med den forskel at der brugtes 1,7 mg peptid II, fremstillet i referenceeksempel 2, i stedet for 2,3 mg peptid I, hvorved der vandtes en peptid II- β -D-galaktosidase.

10 Med undtagelse af nedenstående karakter 5), er de fysiske egenskaber 1), 2), 3), 4), 6), 7), 8) og 9) af dette konjugat identiske med den for det i eksempel 2 vundne konjugat.

5) Dette konjugats molekylvægt er ca. 550000 og dets forhold peptid II/enzym er ca. 9.

Referenceeksempel 9
-----Fremstilling af peptid III- β -D-galaktosidase-konjugat

15 Et konjugat af peptid III og β -D-galaktosidase vandtes ved gentagelse af fremgangsmåden i referenceeksempel 7 med den forskel at der brugtes 1,0 mg peptid III ifølge referenceeksempel 3 i stedet for 2,3 mg peptid I.

20 Med undtagelse af nedenstående karakter 5), er dette konjugats fysiske egenskaber identiske med egenskaberne 1), 2), 3), 4), 6), 7), 8) og 9) af konjugatet ifølge eksempel 2.

5) Konjugatets molekylvægt er ca. 550000 og dets molforhold peptid III/enzym er ca. 11.

Referenceeksempel 10
-----25 Fremstilling af peptid I-alkalisk fosfatase-konjugat

30 I 1 ml af en tynd opløsning af alkalisk fosfatase (0,5 mg/ml) i 0,1M fosfatpuffer (pH 6,8) opløstes der 1,2 mg peptid I, fremstillet ifølge referenceeksempel 1, efterfulgt af tilsætning af 0,1 ml 2% opløsning af GLA. Blandingen fik lov til at reagere ved stuetemperatur i 60 minutter hvorefter den dialyseredes mod 0,02M fosfat-NaCl-puffer (pH 6,8) ved ca. 5°C natten over. Derefter fraskiltes den enzymholdige fraktion ved kromatografisk rensning på en "Sephadex"® G-100

kolonne under anvendelse af fosfat-NaCl-pufferopløsning (pH 6,8), hvorved man vandt det ønskede peptid-enzym-konjugat.

De fysiske egenskaber af dette konjugat er som følger:

- 1) Konjugatet nedbryder fenylfosforsyre og p-nitrofenylfosforsyre, der begge er syntetiske substrater anvendt i EIA, til frigivelse af henholdsvis fenol og p-nitrofenol.
- 2) Det optimale pH-område for den enzymatiske aktivitet er pH 9,3-10,2.
- 3) Mere end ca. 90% af dette enzymatisk aktive konjugat er reaktivt over for anti-hCG-antistof, og dets immunologiske aktivitet såvel som dets enzymatiske aktivitet er stabile i mere end 3 måneder under køleskabsbetingelser.
- 4) Det har molekylvægt ca. 130000 og dets molforhold peptid I/enzym er ca. 13.
- 5) Det er letopløseligt i vandigt medium mellem pH 6 og pH 11.
- 6) Fig. 3 viser ultraviolet absorptionsspektrum for peptid I/alkalisk fosfatase fosfatase-konjugat; absorptionsmaximum ca. 280 nm.
- 7) Aminosyresammensætningen er vist i tabel 3.
- 8) Andre egenskaber af dette konjugat er identiske med dem for alkalisk fosfatase (Boyer "The Enzymes", bind 4 (1971), side 417, Academic Press, New York-London).

Tabel 3

Aminosyre	Antal mol af hver aminosyre i peptid I-alkalisk fosfatase-konjugat pr. 100 mol glycin
Lys	49
His	23
Arg	63
Asp	109
Thr	70
Ser	81
Glu	123
Pro	83
Gly	100
Ala	125
Val	82
Met	-

Tabel 3 (fortsat)

Aminosyre	Antal mol af hver aminosyre i peptid I-alkalisk fosfatase-konjugat pr. 100 mol glycine
Ile	51
Leu	92
5 Tyr	32
Phe	33

Referenceeksempel 11

10 Fremstilling af peptid II-alkalisk fosfatase-konjugat

Et konjugat af peptid II og alkalisk fosfatase fremstilledes ved gentagelse af fremgangsmåden i eksempel 5 med den forskel at der brugtes 0,83 mg peptid II, fremstillet som i referenceeksempel 2, i stedet for 1,2 mg peptid I.

15 Bortset fra nedenstående karakter 4), er dette konjugats fysiske egenskaber identisk med egenskaberne 1), 2), 3), 5), 6), 7) og 8) af konjugatet i eksempel 5.

4) Molekylvægten af dette konjugat er ca. 120000 og dets molforhold peptid II/enzym er ca. 11.

20

Referenceeksempel 12

Fremstilling af peptid III-alkalisk fosfatase-konjugat

25 Et konjugat af peptid III og alkalisk fosfatase fremstilledes ved gentagelse af fremgangsmåden i eksempel 5 med den forskel at der brugtes 0,49 mg peptid III, fremstillet som i referenceeksempel 3 i stedet for 1,2 mg peptid I.

30 Med undtagelse af nedenstående karakter 4), var dette konjugats fysiske egenskaber identiske med egenskaberne 1), 2), 3), 5), 6), 7) og 8) af konjugatet ifølge eksempel 5.

4) Konjugatets molekylvægt er ca. 120000 og dets molforhold peptid III/enzym er ca. 17.

35

Eksempel 1

Isolering af specifikt anti-hCG-antistof

5 g peptid I, vundet i referenceeksempel 1, opløstes i 8 ml 0,1M NaHCO₃ indeholdende 0,5M NaCl. Til denne opløsning sattes der 1 g BrCN-aktiveret "Sephacrose"® 4B, i forvejen vasket med 1/1000 N-HCl. Blandingen omrørtes ved 5°C natten over. Derefter vaskedes "Sephacrosen" godt med 0,1M NaHCO₃-opløsning indeholdende 0,5M NaCl som anvendt ovenfor, efterfulgt af tilsætning af 10 ml 0,5M ætanolamin reguleret til pH 8 med saltsyre. Reaktionen udførtes ved stuetemperatur i 1 time hvorefter "Sephacrosen" vaskedes med (1) 0,1M acetatpuffer indeholdende 1M NaCl (pH 4,0), (2) 0,1M boratpuffer indeholdende 1M NaCl (pH 8,0) og (3) 0,02M boratpuffer indeholdende 0,15M NaCl (pH 8,0) i nævnte rækkefølge. "Sephacrosen" pakkedes derefter i en kolonne.

8 ml af det i referenceeksempel 4 vundne anti-hCG-serum underkastedes fraktioneret fældning med 1,5 g vandfrit natriumsulfat, og den resulterende γ -globulinfraktion overførtes på ovennævnte kolonne af peptid I-"Sephacrose" 4B; kolonnestørrelse 0,9 x 4 cm.

Kolonnen vaskedes med 0,02M boratpuffer indeholdende 0,15M NaCl (pH 8,0) for at fjerne de anti-hCG-antistoffer der udviste krydsreaktivitet med hLH, hFSH og hTSH. Derefter udførtes der eluering med 0,17M glycin-HCl-puffer (pH 2,3) for at udvinde det specifikke anti-hCG-antistof med stærk affinitet til det C-terminale fraktionpeptid af hCG- β (proteinindhold 1,8 mg).

De fysiske egenskaber af det således vundne specifikke antistof er som følger:

- 1) Efter en sluttelig fortynding til 80 ng/ml er dette antistof i stand til at binde ca. 95% af hCG-mærkningsenzymkonjugatet med ca. 2 μ E enzymatisk aktivitet og ca. 35% af peptid II-mærkningsenzymkonjugatet med samme aktivitet.
- 2) Det optimale pH-område for antigen-bindingsaktiviteten af dette antistof er 6-9.
- 3) Ved opbevaring under køleskabsbetingelser forbliver dette antistof stabilt i mere end 1 år.

- 4) Dette antistof har en molekylvægt på ca. 150000 og indeholder 3% sukker.
- 5) Det er letopløseligt i vandigt medium mellem pH 2 og pH 12.
- 6) Dets elektroforetiske opførsel hører til den som udvises af β -globulinfraktionen og udviser vandring hen imod katoden.
- 7) Fig. 1 viser det ultraviolette absorptionspektrum for dette specifikke antistof (absorptionsmaximum ca. 280 nm).
- 8) Aminosyreanalyse af dette antistof er vist i tabel 1.
- 9) Andre egenskaber hos dette antistof er identiske med dem der udvises af immunoglobulin G (Kikuchi et al, Ika Meneki Gaku (Medicinsk immunologi), side 61, Nankodo Inc., Japan, 1976).

Tabel 1

Aminosyre	Antal mol af hver aminosyre i antistoffet pr. 100 mol glycin
Lys	94
His	40
Arg	41
Asp	114
Thr	103
Ser	126
Glu	142
Pro	103
Gly	100
Ala	77
Val	134
Met	3
Ile	33
Leu	109
Tyr	40
Phe	59

Eksempel 2

EIA af hCG

Ved en foreløbig bestemmelse holdtes en blanding af 100 μ l af en fortynding af hvert antiserum, 100 μ l af et pep-

tid- β -D-galaktosidase-konjugat og 300 μ l af en bestemmelses-
puffer (0,02M fosfatpuffer, pH 7,3, indeholdende 0,5% humant
serumalbumin, 0,5% ætylendiamintetraacetat-dinatrium, 2H₂O,
0,1% NaN₃ og 0,1M NaCl) på 5°C i 48 timer, hvorved den enzy-
5 matisk aktive del af peptid- β -D-galaktosidase-konjugatet
(der havde en forudbestemt passende enzymatisk aktivitet
(på ca. 20 μ E/ml)) blev bundet til antiserumet. Til dette sy-
stem sattes der 100 μ l af en suspension på 2,5% anti-kanin-
IgG-antistof-cellulose-komplex, og reaktionen gennemførtes
10 yderligere ved 20°C i 4 timer. Denne blanding centrifugeredes
og sedimentet vaskedes og suspenderedes i 500 μ l af en sub-
stratopløsning (en 20 μ g/ml opløsning af 4-metylbelliferyl-
 β -D-galaktopyranosid i 0,02M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholden-
de 0,1% okse-serumalbumin, 0,1% NaN₃, 0,1M NaCl og 1 mM MgCl₂).
15 Blandingen fik lov til at reagere ved stuetemperatur natten
over. Efter denne reaktion målte fluorescens-intensiteten
af 4-metylbelliferon frigivet ved sønderdeling af substratet
ved en excitations-bølgelængde på 365 nm og en fluorescens-bøl-
gelængde på 450 nm.

20 Bestemmelsen af hCG i en prøvevæske udførtes på følgen-
de måde. Til en blanding af 50 μ l af prøvevæsken og 250 μ l
af bestemmelsespufferen sattes 100 μ l af antiserumet med den
ovenfor nævnte, forudbestemte fortyndingsgrad og 100 μ l af
peptid- β -D-galaktosidase-konjugatet. Derefter udførtes samme
25 procedure som ovenfor beskrevet.

Resultaterne fremgår af fig. 4 og 5.

Fig. 4 er et diagram der viser standardkurver for hCG(o)
og hLH(x) i den foretagne EIA med anvendelse af anti-hCG-anti-
stof fremstillet i referenceeksempel 4 (brudt linje ---) og
30 det specifikke anti-hCG-antistof fremstillet i eksempel 1
(fuldt optrukket linje —). I begge systemer udførtes be-
stemmelsen under anvendelse af hCG-mærkningsenzym-konjugatet.
Resultaterne viser at mens det bestemmelsessystem, der bruger
det specifikke anti-hCG-antistof, er sammenligneligt med det
35 system som bruger anti-hCG-antistoffet med hensyn til følsom-
heden af hCG-opdagelse, så er krydsreaktiviteten af hLH min-
dre end 1/1000 i sammenligning med hCG.

Fig. 5 viser standardkurver for hLH i den foretagne

EIA under anvendelse af anti-hCG-antistof fremstillet i referenceeksempel 4, hvor -o- repræsenterer resultatet for peptid II- β -D-galaktosidase-konjugat og -x- repræsenterer resultatet for hCG- β -D-galaktosidase-konjugatet. Det er tydeligt at krydsreaktiviteten af hLH i peptid II- β -D-galaktosidase-konjugatsystemet er meget lav i sammenligning med hCG-enzym-konjugatsystemet.

I fig. 4 og 5 såvel som fig. 6-12 angiver B den enzymatiske aktivitet bundet til en fast fase i nærværelse af det ønskede peptidhormon, mens B₀ angiver den enzymatiske aktivitet bundet til en fast fase under fravær af det ønskede peptidhormon.

Eksempel 3

EIA af hCG

Som i eksempel 2 henstod prøver indeholdende forskellige fortyndingsgrader af antiserum (bestemmelsespudder 300 μ l, peptid-alkalisk fosfatase-konjugat 100 μ l og antiserum 100 μ l) ved 5°C i 48 timer, hvorved den enzymatiske aktive del af hvert peptid-alkalisk fosfatase-konjugat (der havde en forudbestemt passende aktivitet (ca. 4 mE/ml)) blev bundet til antiserumet. Derefter blev der tilsat 50 μ l antikanin-IgG-serum (en 10 ganges fortynding af et kommercielt antiserum) og 50 μ l fosfat-NaCl-puffer (pH 7,5) indeholdende 2% normalt kaninserum, og blandingen henstod ved 5°C natten over. Derefter centrifugeredes den og sedimentet vaskedes og gensuspenderedes i 500 μ l af en substratopløsning (2 mg/ml p-nitrofenylfosforsyre i 0,05M natriumkarbonatpuffer indeholdende 1 mM MgCl₂ (pH 9,8)). Reaktionen udførtes ved 37°C natten over. Efter denne reaktion målttes absorptionen ved 405 nm af p-nitrofenol som frigivet ved enzymatisk nedbrydning.

hCG i en prøvevæske bestemtes på følgende måde. Til en blanding af 50 μ l af prøvevæsken og 250 μ l af bestemmelsespudderen sættes der 100 μ l af antiserumet med den som ovenfor angivet bestemte fortyndingsfaktor og 100 μ l af peptid-alkalifosfatase, og bestemmelsen udførtes som beskrevet ovenfor. Resultaterne er vist i fig. 6.

Fig. 7 er et lignende diagram som fig. 5 og viser standardkurver for hLH i den foretagne EIA under anvendelse af anti-hCG-antistof fremstillet i referenceeksempel 4, hvor -o- angiver resultatet for peptid I-alkalifosfatase-konjugatet og -x- repræsenterer resultatet for hCG-alkalifosfatase-konjugatet. Det er tydeligt at krydsreaktionen af hLH er forsvindende i det system hvor der anvendes peptid I-alkalifosfatase-konjugatet.

Fig. 6 viser standardkurver for hCG (gengivet ved kurven mærket -o-) og hLH (kurven med -x-) i den EIA hvor der anvendes det specifikke anti-hCG-antistof fremstillet i eksempel 1 og peptid II-mærknings-alkalifosfatase-konjugatet i kombination. I dette bestemmelsessystem er krydsreaktiviteten af hLH praktisk talt forsvindende. Det vil også tydeligt ses at følsomheden af hCG-opdagelsen er sammenlignelig med den der kan opnås med det sædvanlige bestemmelsessystem, og repræsenteret af ---o--- i fig. 4.

Eksempel 4

Specifik enzym-immumbestemmelse for PG

20 1) Fremstilling af anti-PG-serum

I 4 ml 0,2M fosfatpuffer (pH 7,3) blev der opløst 10 mg PG og 20 mg okseserumalbumin (BSA), efterfulgt af tilsætning af en 5% vandig opløsning af glutaraldehyd. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 3 timer hvorefter den dialyseredes mod vand (2 x 4 l vand) ved 4°C og frysetørredes til frembringelse af et immunogen. Dette PG-BSA-konjugat, 2 mg, opløstes i 1 ml fysiologisk kogsaltopløsning og blandedes godt med 1 ml Freund's fuldstændige adjuvans til frembringelse af en emulsion. Denne emulsion injiceredes i begge lårene og subkutant på flere steder af ryggen af kaninen. Ovennævnte fremgangsmåde gentoges ialt 5 gange med mellemrum på 2 uger, og 1 uge efter sidste injicering blev der taget en blodprøve til pilotbestemmelse. På denne måde vandtes der et anti-PG-serum som var reaktivt over for PG og tarm-GLI.

2) Fremstilling af et specifikt anti-PG-antistof

I stedet for 5 mg hCG- β -C-terminalt peptid som beskrevet i eksempel 1, behandlede 5 mg PG-C-terminalt peptid (15-29) (H-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH; se europæisk offentliggjort patentansøgning, 5 skrift nr. 9147, referenceeksempel 1) på den måde der er beskrevet i eksempel 1 til frembringelse af et PG-C-terminalt peptid (15-29)-"Sepharose" 4B-komplex.

Derefter udsaltes 3 ml af det under 1) nævnte anti-PG-serum med vandfrit natriumsulfat og den resulterende γ -globulinfraktion førtes gennem en kolonne (0,9 x 4 cm) af nævnte C-terminale peptid (15-29)-"Sepharose" 4B-komplex. 10

Kolonnen vaskedes med 0,02M boratpuffer (pH 8,0) indeholdende 0,15M NaCl for at eliminere det antistof som var krydsreaktivt over for tarm-GLI. Derefter udførtes eluering 15 med 0,17M glycin-saltsyrepuffer (pH 2,3) for at give et specifikt anti-PG-antistof (proteinindhold 0,35 mg) med stærk affinitet til det C-terminale peptid af PG.

De fysiske egenskaber af dette antistof er som følger. Med undtagelse af karaktererne nr. 1) og 8) er de fysiske 20 egenskaber af ovennævnte antistof analoge med egenskaberne nr. 2), 3), 4), 5), 6), 7) og 9) af antistoffet ifølge eksempel 1.

1) Ved en sluttelig fortynding på 180 ng/ml er dette 25 antistof i stand til at binde 53% af PG- β -D-galaktosidase-konjugatet (europæisk offentliggjort patentansøgning nr. 9147, referenceeksempel 9) og 18% af det PG-C-terminale peptid (21-29)- β -D-galaktosidase-konjugat (samme skrift nr. 9147, eksempel 3), hvis enzymatiske aktivitet er ca. 1 μ E.

8) Aminosyresammensætningen af dette antistof er angivet i tabel 4. 30

3) Bestemmelsesmetode

Ved en foreløbig prøve for hver antistofholdig legems- væske holdtes en blanding af 100 μ l antiserum med varieren- 35 de fortynding, 100 μ l peptid- β -D-galaktosidase-konjugat, 50 μ l "Antagosan" [®] (Hoechst, 10000 enheder/ml) og 250 μ l bestemmelsespuffer (0,02M fosfatpuffer pH 7,3, indeholdende 0,5% humant serumalbumin (i det følgende kaldt HSA), 0,5%

ætylendiamintetraacetat-dinatrium, $2\text{H}_2\text{O}$, 0,1% NaN_3 og 0,1M NaCl) på 5°C i 96 timer, hvorved den enzymatiske aktivitet er hvert peptid- β -D-galaktosidase-konjugat (der havde en forudbestemt passende enzymatisk aktivitet på ca. 10 $\mu\text{E/ml}$) blev bundet til antiserumet. Derefter tilsattes der 100 μl af en 5% anti-kanin-IgG-antistof-cellulose-konjugat-suspension og reaktionen gennemførtes yderligere ved 30°C i 4 timer. Blandingen centrifugeredes og sedimentet vaskedes og suspenderedes i 500 μl af en substratopløsning (en 20 $\mu\text{g/ml}$ opløsning af 4-metylbelliferyl- β -D-galaktopyranosid i 0,01M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 0,1% BSA, 0,1% NaN_3 , 0,1M NaCl og 1 mM MgCl_2), og suspensionen inkuberedes ved stuetemperatur natten over. Efter afslutning af reaktionen målt intensiteten af fluorescensen af den 4-metylbelliferon som var frigivet ved enzymatisk spaltning, idet målingen fandt sted ved en excitations-bølgelængde på 365 nm og en fluorescens-bølgelængde på 450 nm.

Til kvantitativ bestemmelse af pancreatisk glucagon i en prøvevæske sattes 100 μl af antiserumet med en fortyndingsfaktor bestemt som ovenfor angivet og 100 μl af peptid- β -D-galaktosidase-konjugatet til en blanding af 50 μl af prøvevæsken, 50 μl "Antagosan" og 200 μl bestemmelsespudder, og bestemmelse udførtes på den ovenfor beskrevne måde.

Resultaterne er vist i fig. 8.

Fig. 8 viser standardkurver for PG (-o-) og tarm-GLI (-x-) i EIA under anvendelse af anti-PG-serum fremstillet som beskrevet ovenfor under 1), og PG-mærknings- β -D-galaktosidase-konjugat ("Igaku-no-Ayumi" (Fremskridt i Medicinsk Videnskab), bind 103 (1977), side 25; punkteret linje) og det specifikke anti-PG-antistof fremstillet i eksempel 10 (2) samt PG-C-terminalt peptid (21-29)-mærknings- β -D-galaktosidase-konjugat (Journal of Biochemistry, bind 86 (1979), side 943; fuldt optrukket linje). Disse resultater viser at følsomheden af PG-opdagelse med det system i hvilket der udnyttes specifikt anti-PG-antistof er højere end den der sker med systemet som anvender anti-PG-serumet; samt mens anti-PG-serumet udviser en kraftig krydsreaktivitet med tarm-GLI, så udviser det specifikke anti-PG-antistof praktisk talt ingen

krydsreaktivitet med tarm-GLI.

Tabel 4

	<u>Aminosyre</u>	<u>Antal mol af hver aminosyre i antistoffet pr. 100 mol glycin</u>
5	Lys	98
	His	40
	Arg	42
	Asp	112
	Thr	101
10	Ser	132
	Glu	140
	Pro	107
	Gly	100
	Ala	77
15	Val	135
	Met	3
	Ile	33
	Leu	111
	Tyr	41
20	Phe	57

Eksempel 5

β -D-Galaktosidase (fra Boehringer-Manheim, Forbundsrepublikken Tyskland) opløstes i følgende puffere a) og b) (vandige opløsninger). Koncentrationen af β -Gal i hver opløsning var 500 ng/ml.

- 25 a) 0,05M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 5% v/r sukker eller sukkeralkohol (sukkerarterne og sukkeralkoholarterne er angivet i tabel 5), 0,2% okseserumalbumin og 0,001M $MgCl_2$.
- 30 b) Puffer som ovenfor, med den forskel at der hverken var inkorporeret sukker eller sukkeralkohol.

Hvert af de ovennævnte β -Gal-indeholdende vandige præparater blev frosset ved $-40^{\circ}C$ og derefter lyofiliseret ved $10^{\circ}C$ og ≤ 10 mm Hg til frembringelse af et frysetørret materiale. Hvert præparat henstod ved stuetemperatur i 2 uger hvorefter det blev rekonstitueret og dets β -Gal-aktivitet målt.

35 tes. Det omsattes med 4-metylbulliferyl- β -D-galaktopyrano-

sid ved 25°C i 10 minutter. Resultater fremgår af tabel 5.

		<u>Tabel 5</u>
		<u>Enzymatisk aktivitet^x</u>
	<u>Sukker eller sukkeralkohol</u>	
	(a) Arabinose	87
5	Xylose	79
	Xylitol	79
	Ribose	76
	Glukose	86
	Sorbitol	88
10	Fruktose	84
	Mannose	84
	Mannitol	93
	Inositol	95
	Rhamnose	86
15	Sakkarose	96
	Maltose	83
	Cellobiose	82
	Trehalose	88
	Gentiobiose	85
20	Raffinose	91
	Maltotriose	82
	(b) Ej tilsat	8

x Relative værdier med oprindelig aktivitet ansat til 100.

Det ses af ovenstående resultater at de præparater der er rekonstitueret fra lyofilisaterne af β -Gal-holdige vandige præparater a) alle udviser enzymatiske aktiviteter der ikke er under 76% af den oprindelige aktivitet. På den anden side har det præparat der er rekonstitueret fra det β -Gal-holdige vandige præparat b) en enzymatisk aktivitet der kun er på 8% af den oprindelige aktivitet.

Eksempel 6

Det pancreatiske glukagon-C-terminale fragmentpeptid (21-29)- β -Gal-konjugat (offentliggjort europæisk patentansøgning nr. 9147) opløses i vandige opløsninger af følgende puf-

fere a) og b). Koncentrationen af β -Gal i begge opløsningerne var 100 nm/ml.

a) 0,05M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 5%v/r sakkarose, 0,2% okseserumalbumin og 0,001M $MgCl_2$.

5 b) Samme puffer som ovenfor med den forskel at der ikke var sukker til stede.

Begge de ovennævnte vandige præparater indeholdende β -Gal blev frosset ved $-40^\circ C$ og derefter frysetørret ved $10^\circ C$ og ≤ 10 mm Hg. Det frysetørrede præparat skylledes godt med
10 nitrogengas og indelukkedes hermetisk i nitrogenatmosfære. Dette lyofilisat opbevarede ved $10^\circ C$.

Efter 20 uger lukkedes lyofilisatet op. Den enzymatiske aktivitet af et præparat rekonstitueret fra lyofilisat a) var i det væsentlige det samme som den oprindelige aktivitet. En
15 fortynding (100 μl) af denne væske (der havde en forudbestemt passende enzymatisk aktivitet på ca. 10 $\mu E/ml$) blandedes med 100 μl af en varierende fortynding af antiserum (N6E: offentliggjort europæisk patentansøgning nr. 9147), 50 μl "Antagosan" (100000 enheder/ml) og 250 μl bestemmelsespuffer (0,02M
20 fosfatpuffer (pH 7,3) indeholdende 0,5% humant serumalbumin og 0,5% ætylendiamintetraacetat-dinatrium, $2H_2O$, 0,1% NaN_3 og 0,1M NaCl). Blandingen holdtes på en temperatur på $5^\circ C$ på 24 x 4 timer hvorved den enzymatiske aktivitet i den vandige rekonstituerede β -D-galaktosidase-holdige præparat blev bundet
25 til antiserumet. Derefter tilsattes der 100 μl af en 5% suspension af antikanin-IgG-antistof-cellulose-konjugat og reaktionen gennemførtes yderligere ved $30^\circ C$ i 4 timer. Denne reaktionsblanding centrifugeredes, sedimentet vaskedes og suspenderedes i 500 μl af en substratopløsning (20 $\mu g/ml$ 4-metyllumbelliferyl- β -D-galaktopyranosid i 0,01M fosfatpuffer (pH 7,0)
30 indeholdende 0,1% okseserumalbumin, 0,1% NaN_3 , 0,1M NaCl og 1 mM $MgCl_2$). Reaktionen gennemførtes ved stuetemperatur natten over. Efter denne reaktion målttes den fluorescens-intensitet af 4-metyllumbelliferon, der var frigivet ved enzymatisk hydrolyse, idet målingen skete ved en excitation-bølgelængde på
35 365 nm og en fluorescens-bølgelængde på 450 nm.

Bestemmelsen af pancreatisk glukagon i prøvevæsken udførtes på følgende måde. Den ovennævnte forudbestemte fortynd-

ding af antiserum (100 μ l) og 100 μ l af det β -D-galaktosidaseholdige vandige præparat sættes til en blanding af 50 μ l af prøvevæsken, 50 μ l "Antagosan" og 200 μ l af bestemmelsespuferen, hvorpå der fulgtes samme procedure som beskrevet ovenfor for at bestemme titeren af PG.

Fig. 9 viser resultaterne af EIA ved den konkurrerende bindingsmetode der er beskrevet ovenfor. I fig. 9 betegner -o- de resultater der opnåedes med det præparat som var dannet ved rekonstitution fra lyofilisat a); -●- viser resultaterne med det β -Gal-holdige præparat, der ikke havde været underkastet frysetørring. Det ses af fig. 9 at det præparat som vindes ved rekonstitution af lyofilisat a) giver resultater som er identiske med dem som opnås med det ikke-lyofiliserede β -Gal-præparat. Det præparat der vindes ved rekonstitution af lyofilisat b) viser en enzymatisk aktivitet på ikke over 0,1% af den oprindelige aktivitet og kan ikke bruges til EIA.

Eksempel 7

Konjugatet af det hCG- β -C-terminale fragmentpeptid (130-145) (peptid II) og β -Gal, fremstillet i referenceeksempel 8, behandledes på den i eksempel 6 beskrevne måde til fremstilling af lyofilisater a) og b).

Efter 16 uger blev pakningerne med disse to lyofilisater lukket op. Den enzymatiske aktivitet af det præparat som vandtes ved rekonstituering af lyofilisat a) var i det væsentlige den samme som dets oprindelige aktivitet. En forudbestemt fortynding (100 μ l) af denne væske, der havde en forudbestemt passende enzymatisk aktivitet på ca. 20 μ E/ml, blev blandet med 100 μ l af en varierende fortynding af antiserum (det specifikke anti-hCG-antistof) og 300 μ l bestemmelsespufer (0,02M fosfatpufer pH 7,3 indeholdende 0,5% humant serumalbumin, 0,5% ætylendiamintetraacetat-dinatrium, 2H₂O, 0,1% NaN₃ og 0,1M NaCl), og blandingen henstod ved 5°C i 48 timer hvorved den enzymatiske aktivitet af β -D-galaktosidase blev bundet til antiserumet. Derefter tilsattes der 100 μ l af en 2,5% suspension af antikanin-IgG-antistof-cellulosekonjugat og reaktionen gennemførtes yderligere ved 20°C i 4 timer. Denne blanding

centrifugeredes og sedimentet og suspenderes i 500 μ l af en substratopløsning (20 μ g/ml 4-metylbelliferyl- β -D-galaktopyranosid opløst i 0,02M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 0,1% okseserumalbumin, 0,1% NaN_3 , 0,1M NaCl og 1 mM MgCl_2).

5 Reaktionen gennemførtes ved stuetemperatur natten over. Derefter målt fluorescensintensiteten for frigivet 4-metylbelliferon ved enzymatisk hydrolyse, idet målingen skete ved excitation-bølgelængden 365 nm og fluorescens-bølgelængden 450 nm.

10 Titeren af hCG i en prøvevæske bestemtes på følgende måde. Ovennævnte forudbestemte antiserumfortynding (100 μ l) og det β -D-galaktosidaseholdige vandige præparat (100 μ l) sættes til en blanding af 50 μ l prøvevæske og 250 μ l bestemmelsespudder, og der udførtes den samme bestemmelsesprocedure

15 som beskrevet foran.

Fig. 10 viser resultaterne af EIA gennemført ved denne konkurrerende bindingsmetode. I fig. 10 viser -o- de resultater der opnåedes med præparatet rekonstitueret fra lyofilisat a) og -●- viser resultaterne med det ikke-lyofiliserede β -Galholdige vandige præparat. Det ses at præparatet fra lyofilisat a) giver resultater der er sammenlignelige med dem der kan opnås med det ikke-lyofiliserede β -Galholdige vandige præparat. Det præparat der er rekonstitueret fra lyofilisatet b) viser en enzymatisk aktivitet der svarer til kun en smule over 10%

20 af den oprindelige aktivitet, og kan ikke bruges til EIA.

25

Eksempel 8

Det i referenceeksempel 5 fremstillede hCG- β -Gal-konjugat behandledes på den måde der er beskrevet i eksempel 6 til frembringelse af lyofilisater a) og b).

30 Efter 20 ugers forløb blev begge lyofilisater rekonstitueret. Den enzymatiske aktivitet af præparatet fra lyofilisat a) var ikke meget anderledes end den oprindelige værdi.

Fig. 11 viser resultaterne af hCG målt ved EIA i det konkurrerende bindingssystem. I fig. 11 viser kurven med -o- resultater med præparatet fra lyofilisat a), mens kurven med -●- viser resultater med det β -Galholdige vandige præparat. Det ses således af fig. 11 at det præparat der er rekonstitue-

35

ret fra lyofilisat a) giver bestemmelsesresultater der er identiske med dem der kan opnås med det ikke-lyofiliserede β -Galholdige præparat. Præparatet fra lyofilisat b) har en enzymatisk aktivitet på ikke over 10% af den oprindelige aktivitet og kan ikke bruges til EIA.

Eksempel 9

Konjugatet af β -adrenergt lægemiddel (trans-5-hydroxymetyl-6-hydroxy-2-isopropylamino-1,2,3,4-tetrahydro-naftalen-1-ol) og β -Gal (Immunopharmacology, bind 1, side 3, 1979) behandlede på den måde der er beskrevet i eksempel 6 til frembringelse af lyofilisatet a) og b).

Efter 12 uger blev begge lyofilisaterne rekonstitueret. Den enzymatiske aktivitet af præparatet fra lyofilisat a) var praktisk talt identisk med den oprindelige aktivitet.

Fig. 12 viser resultater af EIA af det β -adrenerge lægemiddel ved den konkurrerende bindingsmetode som er beskrevet i eksempel 13. I fig. 12 repræsenterer kurven -o- de resultater der blev opnået med præparatet fra lyofilisat a) og -o- gengiver de resultater der opnåedes med det ikke-lyofiliserede β -Galholdige vandige præparat. Præparatet fra lyofilisat a) gav resultater der var identiske med dem der kan opnås med det ikke-lyofiliserede β -Galholdige vandige præparat. Præparatet ud fra lyofilisatet b) havde en enzymatisk aktivitet der var så lav som ikke over 10% af den oprindelige aktivitet, og det kan ikke bruges til EIA.

Eksempel 10

Det anti-hCG-antistof- β -Gal-konjugat, der fremstilledes ifølge referenceeksempel 6, behandlede på den måde der er beskrevet i eksempel 6 og gav lyofilisater a) og b).

Efter 23 uger blev disse lyofilisater rekonstitueret. Den enzymatiske aktivitet af præparatet dannet ud fra lyofilisat a) var praktisk talt ikke anderledes end den oprindelige værdi.

Eksempel 11

 Et konjugat af anti-humant IgG-antistof (Miles Laboratories, USA) og β -Gal (Journal of Immunology 116, 1554, 1976) blev behandlet på den måde der er beskrevet i eksempel 5 6 til frembringelse af lyofilisater a) og b).

Efter 12 uger blev disse lyofilisater rekonstitueret. Den enzymatiske aktivitet af det præparat der dannedes ud fra lyofilisat a) var i alt væsentligt uændret i forhold til den oprindelige værdi.

10 Eksempel 12

 Det i henhold til referenceeksempel 6 fremstillede konjugat af anti-hCG-antistof og β -Gal blev behandlet på den i eksempel 12 beskrevne måde, dog med den forskel at 5% v/r sakkarose i puffer a) udskiftedes med 3% v/r laktose eller galaktose til frembringelse af lyofilisatet a) og b). 15

Efter 23 uger blev lyofilisaterne rekonstitueret. Den enzymatiske aktivitet af det præparat der var rekonstitueret ud fra det laktoseholdige eller galaktoseholdige lyofilisat (a) udviste overhovedet ingen ændring.

20 Eksempel 13

 Koncentrationen af hCG i urin eller serum fra en normal person og fra en gravid kvinde blev målt på følgende måde under anvendelse af det nedenfor beskrevne hCG-enzym-immunbestemmelsessæt. Resultaterne er vist i tabel 6. hCG-Enzym-immunbestemmelsessættet består af: 25

- 1) Den del af det specifikke anti-humane chorio-gonadotropin-antistof, vundet i henhold til eksempel 1, der binder ca. 40% af den enzymatiske aktivitet af peptid (I)- β -D-galaktosidase-konjugat, sat til reaktionssystemet.
- 30 2) Den del af peptid (II)- β -D-galaktosidase-konjugatet som har en enzymatisk aktivitet på ca. 0,4 μ E.
- 3) Fra 0 til 100 IE standard humant chorio-gonadotropin.
- 4) 0,02M fosfatpuffer indeholdende 0,15M NaCl, 0,5% humant serumalbumin, 0,5% EDTA og 0,1% NaN₃, der bruges til for-

tynding af ovennævnte reagenser 1) til 3) og prøvevæske.

5) En 2,5% v/r suspension af anti-kanin-IgG-cellulosekomplex.

6) 10 µg 4-metylbelliferyl-β-D-galaktosid.

5 7) 0,02M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 0,1M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1% okseserumalbumin og 0,1% NaN₃, der bruges til vask af cellulosen (5) og til opløsning af substratet (6).

8) 0,1M karbonatpuffer, pH 10,5.

10 Fremgangsmåde:

Til 100 µl reagens 1) sættes der 250 µl reagens 4) og 50 µl af enten standard humant chorio-gonadotropin eller den til bestemmelse værende prøve, efterfulgt af tilsætning af 100 µl reagens 2). Blandingen henstod til reaktion ved 4°C i 15 40 timer. Derefter tilsattes der 100 µl reagenssuspension 5), og efter omhyggelig omrøring fortsattes reaktionen ved 20°C i 4 timer. Derpå vaskedes cellulosen med reagens 7) og så tilsattes der 500 µl reagens 6) for at igangsætte den enzymatiske reaktion. Denne reaktion gennemførtes ved 20°C i 16 timer, 20 og ved afslutningen af dette tidsrum bragtes reaktionen til afslutning med 3 ml reagens 8). Intensiteten af fluorescensen i reaktionssystemet målt for at bedømme koncentrationen af humant chorio-gonadotropin i prøvevæsken. Resultaterne fremgår af tabel 6.

25

Tabel 6

Prøve		Titer af hCG (mIE/ml)
Normal menneskeurin	1	26
	2	<3
Urin fra gravid kvinde	1	2.800
	2	>100.000
Normalt menneskeserum	1	16
	2	<3
	3	4
	4	<3
	5	11

35

Tabel 6 (fortsat)

Prøve		Titer af hCG (mIE/ml)
5	Serum fra gravid kvinde	1 28.000
		2 18.800
		3 49.200
10	Serum fra kvinder der har fået pergonale meno- tropiner og hCG	1 210
		2 350
		3 250
		4 80
		5 40
		6 92
		7 400
		8 325
15	Serum fra gravid kvinde i tidligt stadium	1 195
		2 130
		3 115
		4 270
		5 280

Eksempel 14

Koncentrationen af hCG i urin eller serum fra en nor-
mal person og fra en gravid kvinde målt på følgende måde
ved hjælp af det nedenfor beskrevne hCG-enzym-immunbestemmel-
sessæt. Resultaterne er vist i tabel 7.

hCG-enzym-immunbestemmelsessættet består af:

- 1) Den ifølge eksempel 1 vundne portion af det specifikke
anti-humane chorio-gonadotropin-antistof, som binder ca. 40%
af den enzymatiske aktivitet af peptid (I)- β -D-galaktosidase-
konjugatet sat til reaktionssystemet.
- 2) Den portion af det i henhold til eksempel 13 vundne
lyofilisat af peptid (II)- β -D-galaktosidase-konjugat, der
har en enzymatisk aktivitet på ca. 0,4 μ E.
- 3) Fra 0 til 100 IE standard humant chorio-gonadotropin.
- 4) 0,02M fosfatpuffer indeholdende 0,15M NaCl, 0,5% hu-
mant serumalbumin, 0,5% EDTA og 0,1% NaN_3 , der bruges til for-

tynding af ovennævnte reagenser 1) til 3) samt prøvevæsken.

5) En 2,5% v/r suspension af anti-kanin-IgG-cellulosekomplex.

6) 10 µg 4-metylbelliferyl-β-D-galaktosid.

5 7) 0,02M fosfatpuffer (pH 7,0) indeholdende 0,1M NaCl, 1 mM MgCl₂, 01% okseserumalbumin og 0,1% NaN₃, der bruges til vask af cellulosen (5) og til opløsning af substratet (6).

8) 0,1M karbonatpuffer, pH 10,5.

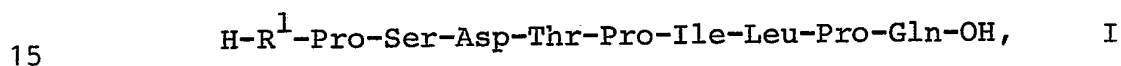
10 EIA-fremgangsmåden gennemførtes i overensstemmelse med den fremgangsmåde der er beskrevet i eksempel 13, og resultaterne er vist i tabel 7.

Tabel 7

Prøve		Titer af hCG (mIE/ml)
15	Normal menneskeurin	1 26
		2 <3
	Urin fra gravid kvinde	1 2.800
		2 >100.000
20	Normalt menneskeserum	1 16
		2 <3
		3 4
		4 <3
		5 11
25	Serum fra gravid kvinde	1 28.000
		2 18.800
		3 49.200
30	Serum fra gravid kvinde på tidligt stadium	1 61
		2 54
		3 285
		4 185
		5 76
35	Serum fra kvinde der har fået en mol ekstraheret	1 54
		2 80
		3 41
		4 100
		5 265

P a t e n t k r a v

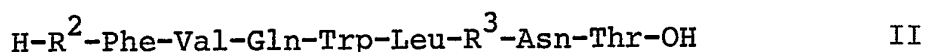
1. Fremgangsmåde til isolering af specifikke antistoffer, k e n d e t e g n e t ved at man bringer et på en bærer uopløseliggjort peptid, der har en struktur som er enestående for et peptid-antigen, i kontakt med en legemsvæske som indeholder det specifikke antistof der er reaktivt over for nævnte antigen, hvorpå man eluerer det således absorberede antistof.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at det specifikke antistof er et anti-humant chorio-gonadotropin-antistof og fremstilles ved at et peptid med formelen



hvor R^1 er et peptidfragment bestående af 1-14 aminosyrerester inklusive Gly i 14-stillingen i peptidet $\text{Ala}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Pro}^4\text{-Ser}^5\text{-Leu}^6\text{-Pro}^7\text{-Ser}^8\text{-Pro}^9\text{-Ser}^{10}\text{-Arg}^{11}\text{-Leu}^{12}\text{-Pro}^{13}\text{-Gly}^{14}$, uopløseliggjort på en bærer, bringes i kontakt med en legemsvæske indeholdende et anti-humant chorio-gonadotropin-antistof, hvorefter det således absorberede anti-humane chorio-gonadotropin-antistof elueres.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved at peptidet er $\text{H-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH}$.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at det specifikke antistof er pancreatisk glukagon-antistof og fremstilles ved at man bringer et på en bærer uopløseliggjort peptid med formelen



hvor R^2 er et peptidfragment med 1-10 aminosyrerester inklusive Asp i 10-stillingen af $\beta\text{-Ala}^1\text{-Tyr}^2\text{-Leu}^3\text{-Asp}^4\text{-Ser}^5\text{-Arg}^6\text{-Arg}^7\text{-Ala}^8\text{-Gln}^9\text{-Asp}^{10}$, og R^3 er Met eller Nle, i kontakt med en legemsvæske indeholdende et anti-pancreatisk glukagon-an-

tistof og derefter eluerer det således absorberede anti-pancreatiske glukagon-antistof.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved at peptidet er H-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-
5 Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH.

6. Fremgangsmåde til enzym-immunbestemmelse under anvendelse af et antistof som reagens, k e n d e t e g n e t ved at man som antistof bruger et antistof, der er isoleret i henhold til krav 1 ved at et på en bærer uopløseliggjort peptid, der har en struktur som er enestående for
10 et peptid-antigen, er bragt i kontakt med en legemsvæske indeholdende et antistof som er reaktivt over for nævnte antigen og det således absorberede antistof derpå er elueret.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved at antistoffet er pancreatisk glukagon-antistof og isoleret ved at et på en bærer uopløseliggjort peptid med
15 formlen

20
$$\text{H-R}^2\text{-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-R}^3\text{-Asn-Thr-OH, II}$$

hvor R^2 er et peptidfragment med 1-10 aminosyrerester inklusive Asp i 10-stillingen i $\beta\text{-Ala}^1\text{-Tyr}^2\text{-Leu}^3\text{-Asp}^4\text{-Ser}^5\text{-Arg}^6\text{-Arg}^7\text{-Ala}^8\text{-Gln}^9\text{-Asp}^{10}$ - og R^3 er Met eller Nle, og bragt i kontakt med en legemsvæske indeholdende et anti-pancreatisk glukagon-antistof, hvorpå det således absorberede anti-pancreatiske glukagon-antistof er elueret.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved at peptidet er H-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-
30 Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 6 til enzym-immunbestemmelse af humant chorio-gonadotropin under anvendelse af antistoffet som reagens i en tilstand hvor det er konjugeret med et mærkningsenzym, k e n d e t e g n e t ved at
35 peptidet er det i krav 2 angivne peptid med den almene formel

H-R-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH I

5 hvor R¹ er et peptidfragment indeholdende 1-14 aminosyre-
rester inklusive Gly i 14-stillingen i peptidet Ala¹-Pro²-
Pro³-Pro⁴-Ser⁵-Leu⁶-Pro⁷-Ser⁸-Pro⁹-Ser¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Pro¹³-
Gly¹⁴.

10

15

20

25

30

35

Fig. 1

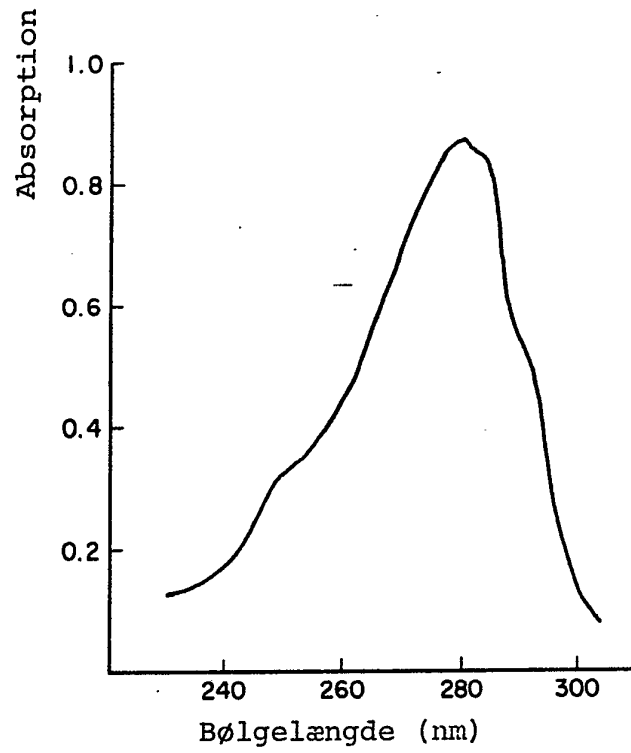


Fig. 2

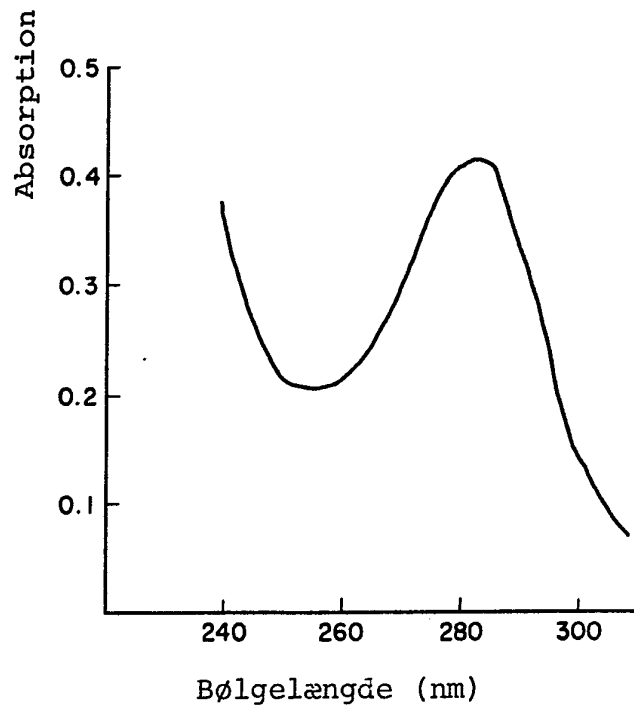


Fig. 3

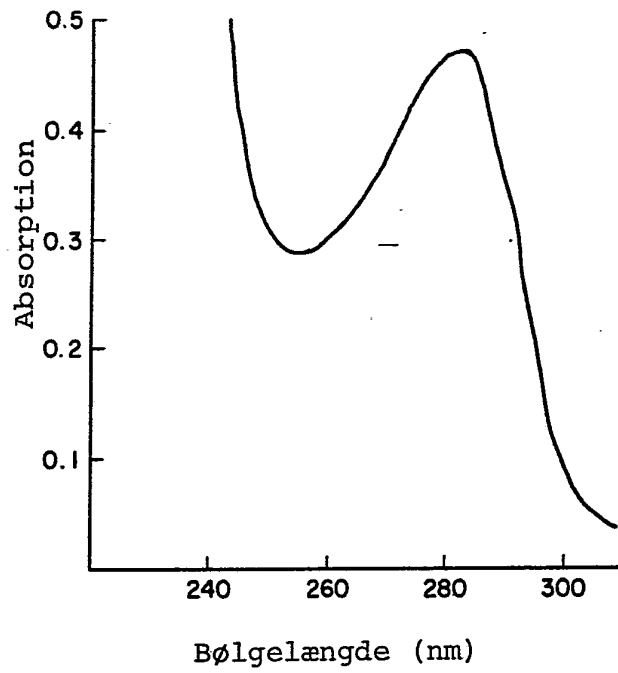


Fig. 4

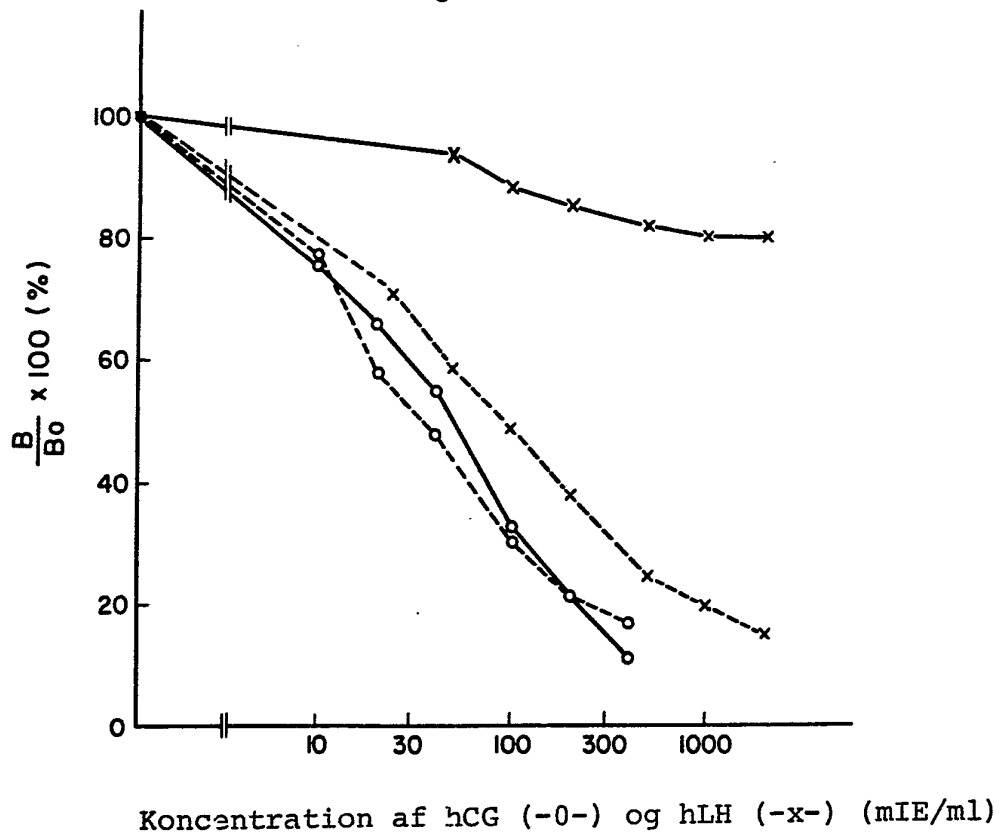


Fig. 5

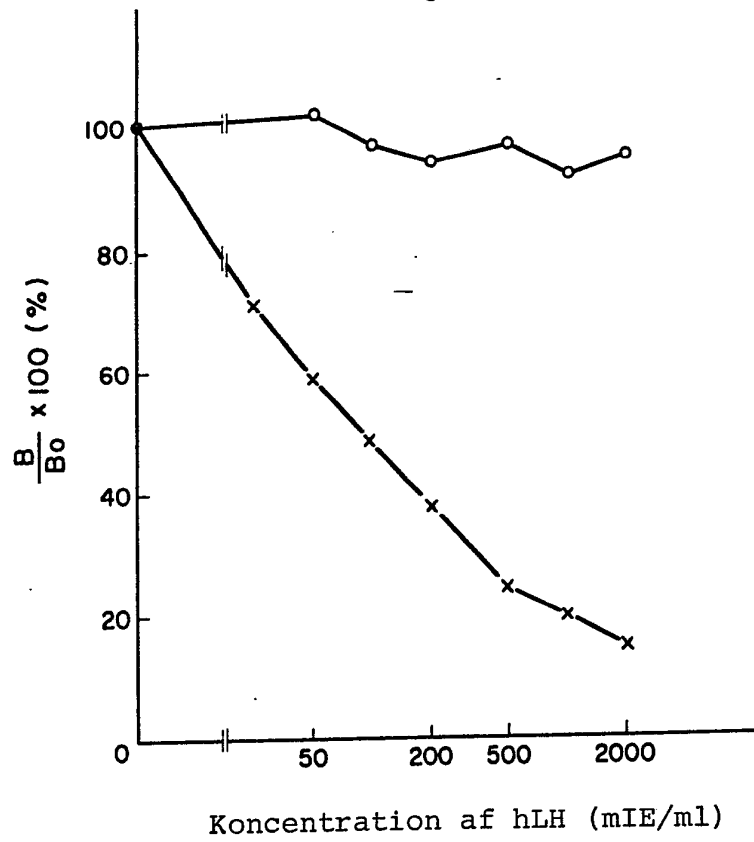


Fig. 6

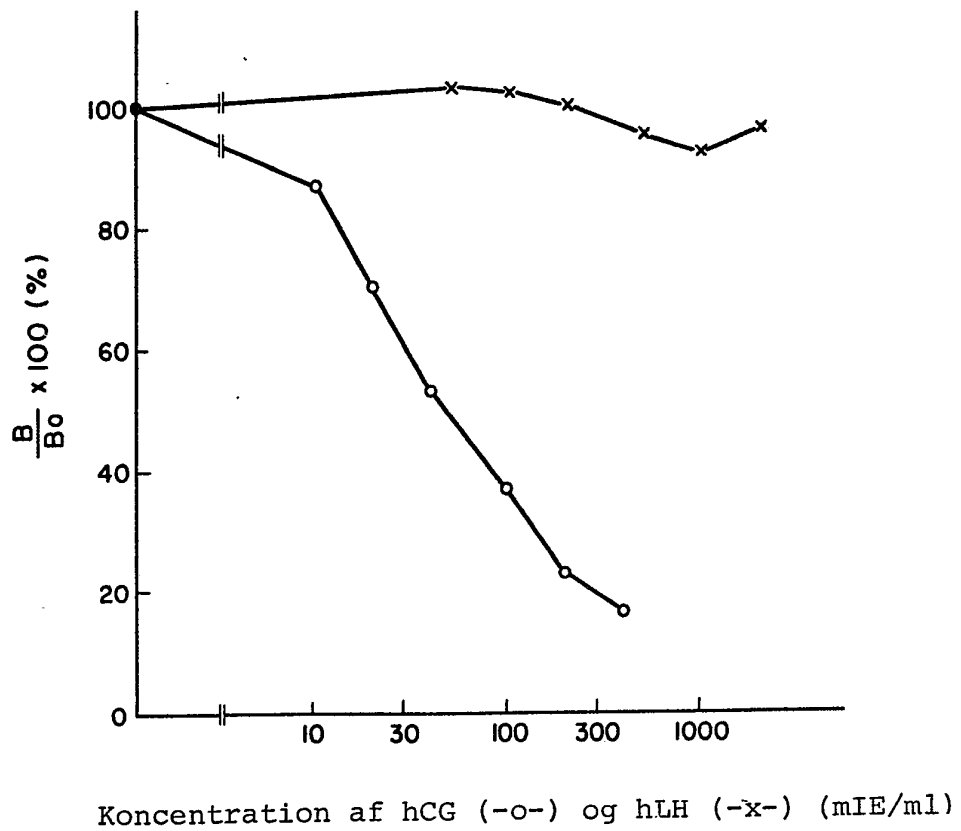


Fig. 7

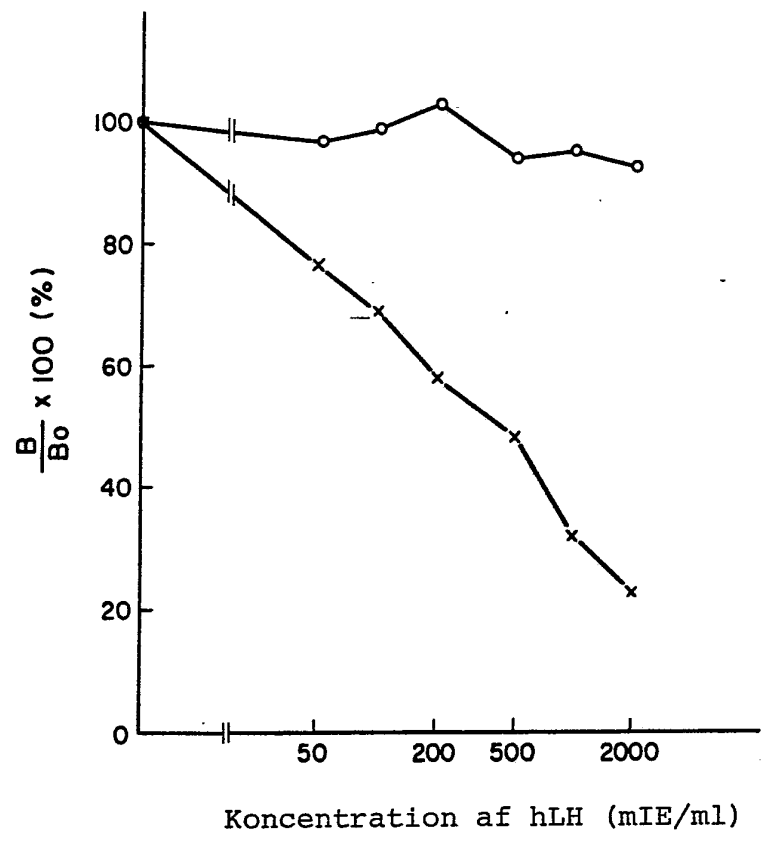


Fig. 8

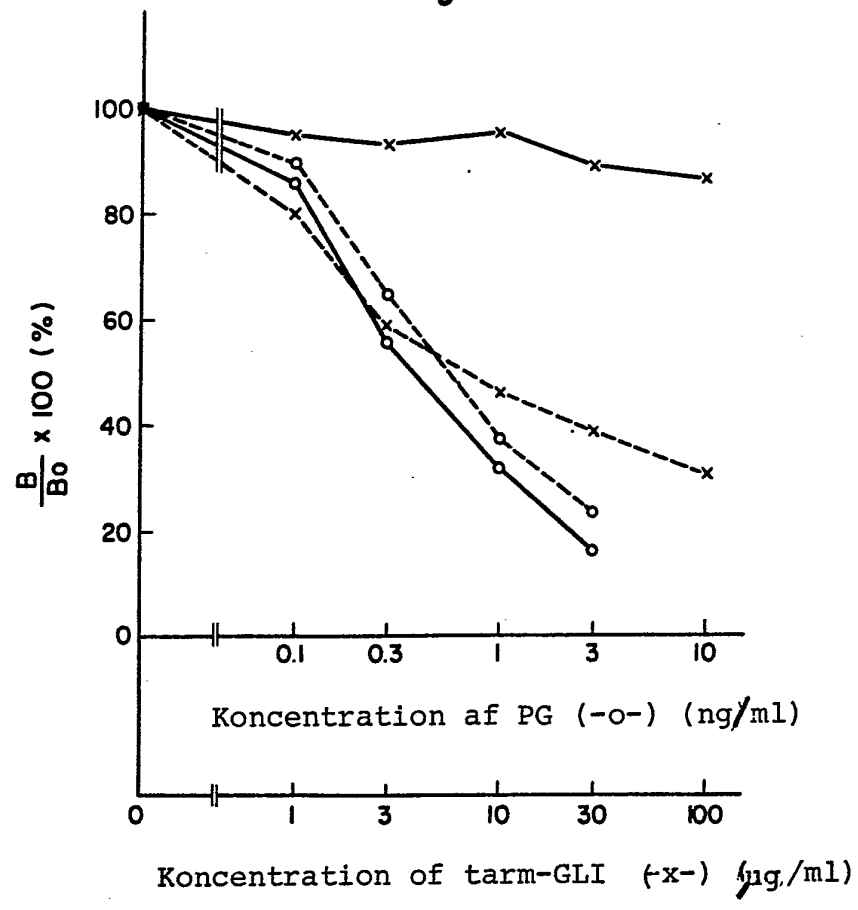


Fig. 9

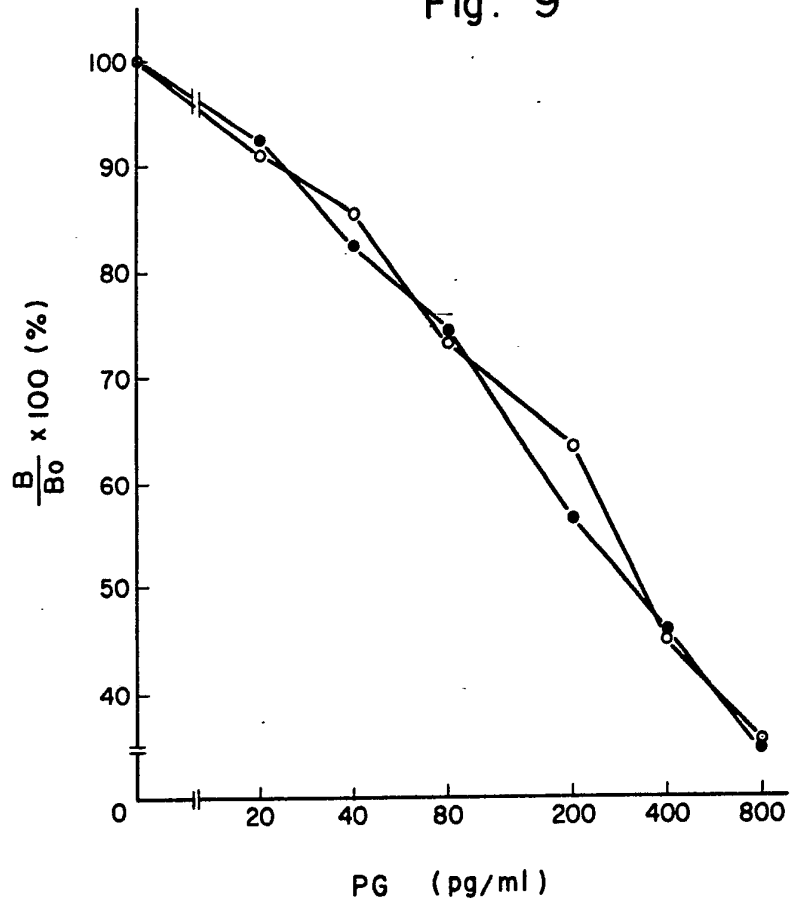


Fig. 10

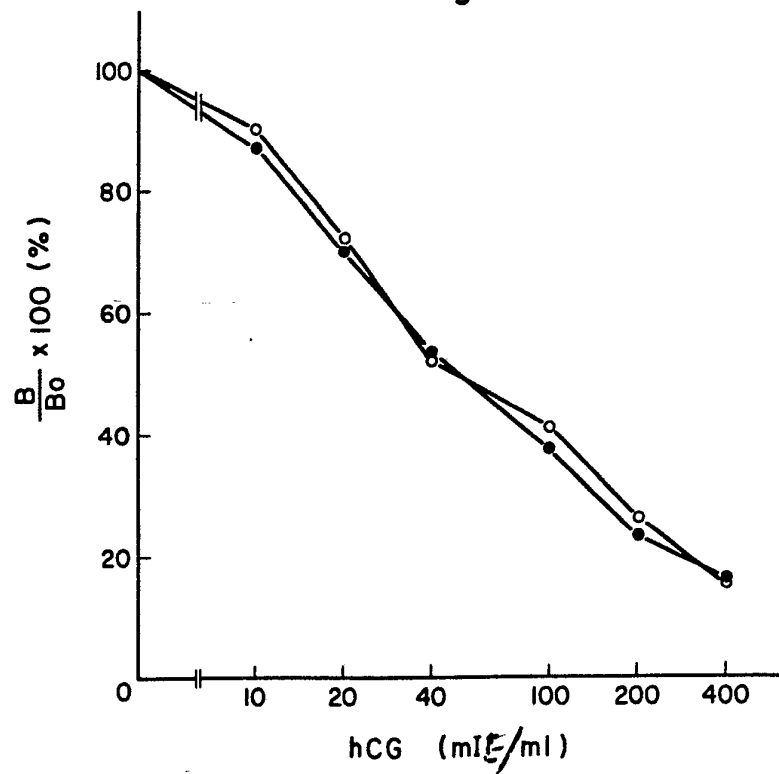


Fig. 11

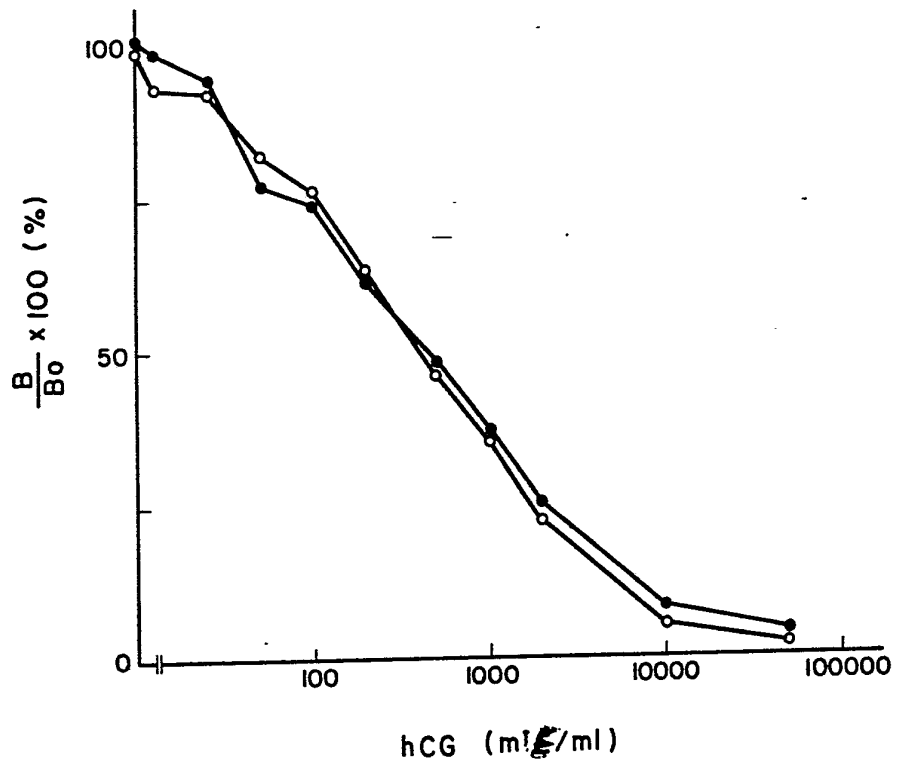


Fig. 12

